



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Interacción del etileno con el contenido de
antioxidantes, su estado redox y
las especies activas de oxígeno
durante el desarrollo foliar

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Naturales

Ing. Agr. Ing. Ftal. Gustavo Esteban Gergoff Grozeff

Tesista

Dr. Carlos Guillermo Bartoli

Director

Dra. Alicia Raquel Chaves

Codirectora

2012

Índice

	Página
Indice	I
Agradecimientos	V
Publicaciones	VII
Glosario	IX
1. Introducción	1
1.1 Consumo de espinaca	2
1.2 Importancia nutricional de la espinaca	2
1.3 Antioxidantes y especies activas del oxígeno en vegetales de consumo humano	3
1.4 Producción de especies activas del oxígeno en plantas	4
1.5 Sistemas antioxidantes en plantas	6
1.6 Importancia de los antioxidantes no enzimáticos en la dieta de humanos	7
1.7 Importancia de la vitamina C	8
1.8 Importancia de la vitamina E	9
1.9 Funciones del ácido ascórbico en plantas	11
1.10 Síntesis del ácido ascórbico en plantas	12
1.11 Funciones y vía de síntesis del glutatión	16
1.12 Vía de síntesis de los tocoferoles	18
1.13 Condiciones para la comercialización de espinaca	20
1.14 Vinculación entre el etileno, las especies activas del oxígeno y la acumulación de antioxidantes	20
1.15 Vía de síntesis de etileno	21
1.16 Señalización por medio de receptores de etileno	23
1.17 Factores primarios de transcripción	26
1.18 Inhibidores de la acción del etileno	26
1.19 Efecto de la luz sobre el contenido de antioxidantes	27
1.20 Efecto de la luz como factor de morfogénesis y modulador de la acumulación de antioxidantes	27
2. Hipótesis y Objetivos	29
3. Materiales y métodos	33
3.1 Material Vegetal	34
3.2 Tratamientos	36
3.2.1 Etefón	36
3.2.2 1-MCP (Smart Fresh TM)	36

3.2.3 Pulsos de luz	37
3.2.4 Tratamientos de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh	39
3.3 Parámetros determinados	39
3.3.1 Fuga de solutos	39
3.3.2 Contenido de clorofila	40
3.3.3 Rendimiento cuántico potencial del fotosistema II	40
3.3.4 Contenido de proteína soluble	40
3.3.5 Contenido de AA y DHA	41
3.3.6 Contenido de GSH y GSSG	41
3.3.7 Determinación de MDA	43
3.3.8 Determinación de α - y γ -tocoferol	44
3.3.9 Liberación de peróxido de hidrógeno <i>in vivo</i>	44
3.3.10 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes	45
3.3.11 Actividad <i>in vitro</i> de MDHAR	45
3.3.12 Actividad <i>in vitro</i> de DHAR	46
3.3.13 Actividad <i>in vitro</i> de CAT	46
3.3.14 Actividad <i>in vitro</i> de APXc y APXm	46
3.3.15 Actividad de GLDH <i>in vitro</i>	47
3.3.16 Actividad de GLDH <i>in vivo</i>	48
3.3.17 Determinación del punto de compensación lumínico en hojas de espinaca	48
3.3.18 Determinación de a producción de etileno	48
3.3.19 Determinación de la actividad respiratoria	49
3.3.20 Análisis estadístico	49
4. Resultados y Discusión	50
4.1 Capítulo I	51
4.1.1 Caracterización de la senescencia en hojas jóvenes y maduras de espinaca durante la postcosecha temprana	52
4.1.2 Estrés oxidativo en hojas jóvenes y maduras de espinaca en postcosecha	56
4.2 Capítulo II	61
4.2.1 Contenido de AA y su estado redox en hojas jóvenes y maduras durante la senescencia temprana ocasionada por oscuridad y etileno	62
4.2.2 Efecto del tratamiento de etefón sobre los parámetros de senescencia en hojas jóvenes y maduras de espinaca	63
4.2.3 Estrés oxidativo en hojas jóvenes y maduras de espinaca en postcosecha tratadas con etefón	67
4.2.4 Efecto del etefón sobre el contenido y estado redox de los antioxidantes en hojas jóvenes y maduras de espinaca	72

4.3 Capítulo III	83
4.3.1 Caracterización del contenido de antioxidantes de mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh de respuesta diferencial al etileno	84
4.3.2 Variación de los parámetros de senescencia sobre mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh de respuesta constitutiva e insensibilidad al etileno	85
4.3.3 Variación del contenido de antioxidantes hidrosolubles en mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh con respuesta constitutiva e insensibilidad al etileno	88
4.3.4 Variación del contenido de antioxidantes liposolubles en mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh de respuesta constitutiva e insensibilidad al etileno	91
4.4 Capítulo IV	97
4.4.1.1 Efecto del 1-MCP sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca durante el almacenamiento en oscuridad	98
4.4.1.2 Efecto del 1-MCP sobre la senescencia y la producción de etileno en hojas maduras de espinaca	99
4.4.1.3 Efecto del 1-MCP sobre el contenido de antioxidantes en hojas maduras de espinaca	103
4.4.2 Efecto de las bajas temperaturas y del 1-MCP sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca	106
4.5 Capítulo V	112
4.5.1 Efecto combinado de los pulsos de luz con 1-MCP y refrigeración sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca	113
4.5.1.1 Punto de compensación lumínico de hojas maduras de espinaca	114
4.5.1.2 Efecto de pulsos cortos de luz sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca	115
4.5.1.2 Efecto de pulsos cortos de luz sobre el contenido de antioxidantes en hojas maduras de espinaca	120
4.5.2.1 Efecto de los pulsos de luz localizados sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca	127
4.5.2.2 Efecto de los pulsos de luz localizados sobre el contenido de antioxidantes solubles en hojas maduras de espinaca	131
4.5.3 Efecto de los pulsos cortos de luz combinados con 1-MCP en hojas maduras de espinaca	135
4.5.3.1 Efecto de los pulsos cortos de luz combinados con 1-MCP sobre la senescencia en hojas maduras de espinaca	136
4.5.3.2 Efecto de los pulsos cortos de luz combinados con 1-MCP sobre el estrés oxidativo en hojas maduras de espinaca	138

4.5.3.3 Efecto de los pulsos cortos de luz combinados con 1-MCP sobre el contenido de antioxidantes hidrosolubles en hojas maduras de espinaca	140
5. Conclusiones	149
6. Referencias	151
7. Resumen	178

*A Patricia por su amor incondicional y
a Denisse por llegar a nuestras vidas*

Agradecimientos

A mi director, Dr. Carlos Guillermo Bartoli, por guiarme en el tortuoso camino que implica una tesis doctoral y por haberme dado su confianza en el trabajo del día a día desde que todavía era un alumno de grado.

A mi codirectora, Dra. Alicia Raquel Chaves, por brindarme su apoyo y consejo en los experimentos que se llevaron a cabo en esta tesis. También por haberme dado la oportunidad de trabajar en aquel proyecto de “tecnologías limpias de postcosecha”, que fue el germen de esta línea de trabajo.

Al CONICET, por haberme brindado la oportunidad de poder desarrollar este doctorado con las becas Tipo I y II, junto con el financiamiento de dos proyectos (PIP 1760 y PIP 5937).

A los integrantes de la Estación Experimental Julio A. Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP) por haberme ofrecido desinteresadamente el lugar para el cultivo de espinaca, sin el cual no hubiera sido posible la presente tesis.

Al Dr. Juan José Guimet por las charlas de última hora en el instituto y por dejarme aportar mi grano de arena al proyecto N490 de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNLP.

Al Ing. Agr. José Beltrano, por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo en el INFIVE.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP), por haberme dado en esta última etapa mi primer subsidio como becario (Expte: 1000-007351/2011).

A todos mis compañeros del INFIVE, tanto becarios, personal auxiliar e investigadores, por su apoyo, consejo y amistad creada en el seno del trabajo conjunto que aprendimos a compartir.

A mi familia por ser la compañía en todos los momentos y por ofrecer el aliento para llevar adelante el trabajo.

Parte de estos resultados fueron presentados en:

Publicaciones:

1. Gergoff Grozeff, G., Micieli, M.E., Gomez, F., Fernández, L., Guiamet, J.J., Chaves, A.R., Bartoli, C.G. 2010. 1-Methyl cyclopropene extends postharvest life of spinach leaves. *Postharvest Biology and Technology* 55:182–185
2. Gergoff, G., Bartoli, C.G., Chaves, A.R. 2010. Ethylene regulates ascorbic acid content during dark-induced leaf senescence. *Plant Science* 178: 207-212

Presentaciones a congresos:

Evento: **VI Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología de Postcosecha**

Carácter de participación: Expositor

Lugar: Mendoza, 23 al 25 de noviembre de 2011

Título del tema expuesto: **Pulsos de luz de baja irradiancia combinados con 1-MCP mejoran la calidad postcosecha de espinaca (*Spinacia oleracea* cv. Bison)**

Autores: **Gergoff Grozeff, Gustavo**; Chaves, Alicia y Bartoli, Carlos

Evento: **XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal**

Carácter de participación: Expositor

Lugar: La Plata, 26 al 29 de septiembre de 2010

Título del tema expuesto: **Low irradiance pulses improve postharvest quality of spinach leaves (*Spinacia oleracea* L. cv Bison)**

Autores: **Gergoff Grozeff, Gustavo**; Chaves, Alicia R.; Bartoli, Carlos G.

Evento: **V Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología de Postcosecha**

Carácter de participación: Expositor

Lugar: San Pedro, Pcia. Buenos Aires - 27 y 28 de octubre de 2009

Título del tema expuesto: **Caracterización del contenido de antioxidantes de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta diferencial al etileno**

Autores: **Gergoff Grozeff, Gustavo**; Chaves, Alicia y Bartoli, Carlos

Evento: **V Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología de Postcosecha**

Carácter de participación: Expositor (seleccionado para exposición oral)

Lugar: San Pedro, Pcia. Buenos Aires - 27 y 28 de octubre de 2009

Título del tema expuesto: **Pulsos de luz aumentan la vida postcosecha en hojas de espinaca (*Spinacea oleracea* L. cv. Bison)**

Autores: **Gergoff Grozeff, Gustavo**; Chaves, Alicia y Bartoli, Carlos

Evento: **XIII Reunión Latinoamericana – XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal.**

Carácter de participación: Expositor

Lugar: Rosario, Argentina. 21 al 24 de septiembre de 2008

Título del tema expuesto: **Efecto del etileno sobre el contenido foliar de antioxidantes durante la senescencia inducida por oscuridad**

Autores: **Gustavo Gergoff**, Alicia Chaves y Carlos G Bartoli.

Evento: **ROS in Plants “Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants” A SFFR Plant Oxygen Group Meeting.**

Carácter de participación: Expositor

Lugar: Ghent, Belgium. Fecha: 12 – 14 de septiembre de 2007

Título del tema expuesto: **Ethylene treatment modifies leaf ascorbic acid content.**

Autores: **G. Gergoff**, A. Chaves and C. Guillermo Bartoli.

Glosario

1-MCP: 1-metilciclopropeno

AA: Ácido ascórbico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APXc: Ascorbato peroxidasa fracción citosólica

APXm: Ascorbato peroxidasa fracción membrana

ATP: Adenosiltrifosfato

BSA: Suero de albúmina bovina (del inglés *Bovine Serum Albumin*)

CAT: Catalasa

DHA: Ácido dehidroascórbico

DHAR: Dehidroascorbato reductasa

DTT: Ditioneitol

EAO: Especies activas del oxígeno (en inglés *Reactive Oxygen Species - ROS*)

EDTA: Etilendiaminotetraacético

F_v/F_m : Rendimiento cuántico potencial del fotosistema II

GL: L-galactona-1,4-lactona

GLDH: L-galactona-1,4-lactona deshidrogenasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia (del inglés *High-Performance Liquid Chromatography*)

MDA: Malondialdehído

MDHA: Ácido monodehidroascórbico

MDHAR: Monodehidroascorbato reductasa

MOPS: Ácido 3-N-(morfolino)propanosulfúrico

NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

PF: Peso sobre base fresca

PS: Peso sobre base seca

PVP: Polivinilpirrolidona

SOD: Superóxido dismutasa

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TFA: Ácido trifluoracético

TRIS: Hidroximetilaminometano

1. Introducción

1. Introducción

De acuerdo a las estadísticas recopiladas por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), la producción de espinaca para el año 2008 fue de 14.576.697 toneladas a nivel mundial. Teniendo en cuenta las producciones individuales por país, China se presenta como el gran productor, llegando a producir casi el 86 % del total, siguiéndole Estados Unidos con el 2,3 %, Japón con el 2,1 %, Turquía con el 1,5 % e Indonesia con el 1,04 %.

1.1 Consumo de espinaca

De acuerdo a las estadísticas llevadas a cabo por el USDA en Estados Unidos (United States Department of Agriculture, 2004), se ha llegado a la conclusión que la espinaca es un producto que se consume fundamentalmente en el hogar, habiendo pocas opciones en otros comercios para ser consumida fuera de casa. Por otro lado, la aparición en el mercado de bandejas con una oferta variada de vegetales, las espinacas prelavadas y la aparición de las denominadas “baby spinach”, han hecho que las ventas de espinaca en fresco aumentaran, mientras que las conservas y enlatados han disminuido su demanda. Por otro lado el consumo de espinaca fresca fuera del hogar sólo representa el 2 % del mercado total, demostrando la poca oferta en el menú de los restaurantes. Esto muestra a las claras que el público en general prefiere las espinacas frescas a las enlatadas, y que destina parte de su tiempo para ir a comprarlas (el 87 % de la espinaca fresca es obtenida de comercios minoristas) y prepararlas en la casa (91 % de los consumidores) (Lucier G. *et al.*, 2004).

1.2 Importancia nutricional de la espinaca

Los alimentos vegetales poseen casi todos los nutrientes orgánicos y minerales que son considerados como esenciales para la nutrición humana. Debido a que muchos de estos componentes en ciertas ocasiones se encuentran en bajas concentraciones, se hace indispensable el estudio de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y

moleculares que se ponen en juego en el transporte, síntesis y acumulación en las plantas. De esta manera se puede mejorar la calidad de los productos a través del manejo del cultivo (Grusak, 1999).

La espinaca (*Spinacia oleracea* L.) es una planta anual de la familia de las Amaranthaceae, subfamilia Chenopodioideae (Müller & Borsch, 2005), cultivada por sus hojas comestibles. Las hojas son utilizadas en Argentina principalmente para su consumo en fresco. La demanda en fresco anual es de 1,15 kg/persona. Desde el punto de vista nutricional es una hortaliza con un moderado contenido en minerales y vitaminas, especialmente hierro y vitaminas A y C. También posee un contenido importante de proteínas y bajo contenido lipídico. Las espinacas de buena calidad no deben presentar hojas amarillas o partes florales. Es una hortaliza altamente perecedera (vida postcosecha menor a dos semanas), debido a la alta actividad respiratoria (Kader, 2002) y a la elevada pérdida de agua. Es un producto con baja producción de etileno pero altamente susceptible al mismo, lo cual se manifiesta a través del amarillamiento y desverdizado de las hojas (López-Ayerra *et al.*, 1998), aumento en la peroxidación de lípidos (López-Ayerra *et al.*, 1998), pérdida de antioxidantes solubles como el AA y el glutatión (Hodges & Forney, 2000) y aumento de pudriciones.

1.3 Antioxidantes y especies activas del oxígeno en vegetales de consumo humano

Los antioxidantes son compuestos naturales sintetizados por los vegetales que cumplen funciones biológicas básicas tanto en plantas como en animales. La importancia de los antioxidantes está relacionada a su capacidad de reaccionar con especies activas del oxígeno (EAO) que son formas químicas con una elevada capacidad de producir deterioro oxidativo en los sistemas biológicos (Noctor & Foyer, 1998). Los antioxidantes pueden ser hidrosolubles como el ácido ascórbico (Vitamina C) y el glutatión (Foyer & Noctor, 2011) o liposolubles como los carotenos (Tanaka *et al.*, 2008) o el α -tocoferol (Vitamina E); estos dos últimos se encuentran localizados en membranas cloroplásticas (Della Pena, 2005).

La presencia de altas concentraciones de antioxidantes y/o vitaminas en

vegetales destinados a consumo humano es importante desde dos puntos de vista:

1. Nutricional: Una dieta enriquecida en ciertos antioxidantes naturales previene diversas patologías en el hombre (Davey *et al.*, 2000).
2. Vida postcosecha de vegetales: En algunos casos, altos contenidos de antioxidantes demoran los procesos degradativos involucrados en la senescencia o envejecimiento de vegetales durante su almacenamiento (Garg & Kapoor, 1972; Barth *et al.*, 2006).

La participación de las EAO en la senescencia de los vegetales ha sido reportada para numerosos órganos vegetales, como flores, hojas o frutos (Bartoli *et al.*, 1996; Novabpour *et al.*, 2003; Mach *et al.*, 2004). Asimismo, se ha demostrado en ciertos casos que los antioxidantes pueden jugar un papel importante para la extensión de la vida de vegetales (Keller *et al.*, 1999; Barth *et al.*, 2004) y que disminuyen abruptamente su concentración en los tejidos a medida que envejecen durante el almacenaje, como es el caso del AA (Bartoli *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 1999; Hodges *et al.*, 2000). Además de su función antioxidante, estos compuestos tienen cumplen muchos otros procesos protectores o de síntesis que tienen lugar en tejidos vegetales, mencionándose la disipación de exceso de energía (Niyogi, 2000), retardo de la degradación de clorofila (Borraccino *et al.*, 1994; Kingston-Smith *et al.*, 1997), expansión y división celulares, síntesis de hormonas y otros (Smirnoff, 1996).

Pese a la reconocida importancia que tiene la presencia de altos contenidos de antioxidantes en vegetales de consumo humano, es escaso el conocimiento sobre los factores que regulan su acumulación en los tejidos de las plantas. Desde el punto de vista de la alimentación humana, el estudio de los factores y procesos que elevan los niveles de antioxidantes en plantas podría eventualmente contribuir a la obtención de órganos vegetales con una mayor calidad nutritiva.

1.4 Producción de Especies Activas del Oxígeno en plantas

Las EAO son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico (O_2). Son producidas como resultado de la excitación del O_2 para formar oxígeno singulete (O_2^1), como así también pueden formarse a partir de la transferencia de uno, dos o tres electrones al oxígeno para formar respectivamente el radical superóxido (O_2^\bullet), el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo (HO^\bullet) (Mittler, 2002). En condiciones fisiológicas normales las células producen EAO que son atrapadas o controlados por antioxidantes, pero en situaciones tales en las que la producción de EAO superan las defensas celulares se produce daño celular (Noctor & Foyer, 1998). En contraposición al oxígeno atmosférico, las EAO son capaces de oxidar irrestrictamente diferentes componentes celulares y provocar en la célula daños oxidativos severos (Asada, 1999). Esta situación es denominada *estrés oxidativo* (Simontacchi & Puntarulo, 1994).

En órganos fotosintéticos, la principal fuente de EAO son los cloroplastos, teniendo una gran capacidad de producir radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, especialmente durante la fase de fijación del carbono. Los cloroplastos, a su vez, pueden producir oxígeno singlete a partir de la excitación de moléculas de clorofila (Galvez-Valdivieso & Mullineaux, 2010).

Por otro lado, en órganos no fotosintéticos, las mitocondrias son la fuente más importante de producción de EAO; sin embargo en órganos fotosintezantes, el aporte de las mitocondrias es despreciable (Navrot *et al.*, 2007). El estatus redox de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria es un indicador del estatus energético de la célula (estado redox de la ubiquinona) y de la producción de EAO (especialmente el radical superóxido producido en los complejos I y III) (Taylor *et al.*, 2009).

La tercera fuente de EAO son los peroxisomas. Contienen ciertas oxidasas intrínsecas que producen peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete. La glicolato oxidasa se encuentra ubicada en los peroxisomas y cumple una función relevante ante la aparición de algún estrés abiótico, produciendo el cierre estomático y consecuentemente una baja en la disponibilidad de CO_2 para RUBISCO, seguido de un incremento en la fotorespiración y en la producción de peróxido de hidrógeno (Foyer & Noctor, 2009).

Ante la presencia de metales activos en la célula, también se pueden producir EAO, como por ejemplo la formación del radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno por medio de la reacción de Fenton o la formación de oxígeno singlete a partir del peróxido de hidrógeno por medio de la reacción de Haber-Weiss (Halliwell, 2006; Møller *et al.*, 2007).

Las NADPH oxidasas son otra fuente importante de EAO en plantas, produciendo oxígeno singlete que es rápidamente dismutado a peróxido de hidrógeno. Se han

encontrado 10 isoformas que codifican para estas enzimas, participando en diferentes procesos (Foreman *et al.*, 2003; Monshausen & Gilroy, 2009; Kwak *et al.*, 2003; Torres & Dangl, 2005).

A pesar de que las EAO son más conocidas, el óxido nítrico y las oxilipinas (Mueller & Berger, 2009) son también producidas comúnmente en el metabolismo celular (Halliwell, 2006). El óxido nítrico se encuentra fuertemente asociado a la señalización por estrés (Moreau *et al.*, 2010).

En la Tabla I se resumen los principales mecanismos de producción de EAO en las células vegetales.

<i>Mecanismos de Producción</i>	<i>Localización</i>	<i>EAO</i>	<i>Referencias</i>
Fotosíntesis (Fotosistemas I y II)	Cloroplasto	O_2^{\bullet}	Asada & Takahashi (1987); Asada (1999)
Cadena transportadora de electrones respiratoria	Mitocondria	O_2^{\bullet}	Grant & Loake (2000); Maxwell <i>et al.</i> (1999)
Glicolato oxidasa	Peroxisoma	H_2O_2	Corpas <i>et al.</i> (2001)
Clorofila excitada	Cloroplasto	O_2^1	Asada & Takahashi (1987)
NADPH oxidasa	Membrana plasmática	O_2^{\bullet}	Hammond-Kosack & Jones, (1996); Grant & Loake (2000)
β -oxidación de ácidos grasos	Peroxisoma	H_2O_2	Corpas <i>et al.</i> (2001)
Oxalato oxidasa	Apoplasto	H_2O_2	Dat <i>et al.</i> (2000)
Xantina oxidasa	Peroxisoma	O_2^{\bullet}	Corpas <i>et al.</i> (2001)
Peroxidasas, Mn^{+2} y NADH	Pared celular	H_2O_2 , O_2^{\bullet}	Hammond-Kosack & Jones, (1996); Grant & Loake (2000)
Amino oxidasa	Apoplasto	H_2O_2	Allan & Fluhr (1997)

Tabla I. Mecanismos productores de EAO en plantas (adaptado de Mittler, 2002)

1.5 Sistemas antioxidantes en plantas

Los sistemas antioxidantes pueden ser clasificados en enzimáticos y no enzimáticos. En el primer grupo se encuentran enzimas como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, ascorbato peroxidasa, entre otras. Muchas de estas enzimas están constituidas por isoenzimas que se localizan en distintos sitios subcelulares, como la APX (Shigeoka *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2004) y la SOD (Gómez *et al.*, 2004). Los sistemas antioxidantes no enzimáticos se subdividen en hidro y

liposolubles. Entre los primeros se encuentran el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico (vitamina C) (Smirnoff *et al.*, 2001) y el glutatión (Noctor *et al.*, 1998; Noctor & Foyer, 1998). Entre los segundos los carotenos (Cazzonelli & Pogson, 2010; Bartley & Scolnik, 1995) y los tocoferoles (vitamina E) (Dörmann, 2007).

En la Tabla II se resumen los principales sistemas antioxidantes en plantas, junto con su localización y las EAO sobre las que actúan.

<i>Sistemas antioxidantes</i>	<i>Localización</i>	<i>EAO</i>	<i>Referencias</i>
Superóxido dismutasa	Cloroplasto, Citosol, Mitocondria, Peroxisoma, Apoplasto	O_2^{\bullet}	Browler <i>et al.</i> (1992)
Ascorbato peroxidasa	Cloroplasto, Citosol, Mitocondria, Peroxisoma, Apoplasto	H_2O_2	Asada & Takahashi (1987); Asada (1999)
Catalasa	Peroxisoma	H_2O_2	Willekens <i>et al.</i> (1997)
Glutatión peroxidasa	Citosol	H_2O_2 , ROOH	Dixon <i>et al.</i> (1998)
Peroxidasas	Pared celular, Citosol, Vacuola	H_2O_2	Asada & Takahashi (1987)
Tioredoxina peroxidasa	Cloroplasto, Citosol, Mitocondria	H_2O_2	Baier & Dietz (1996)
Ácido ascórbico	Cloroplasto, Citosol, Mitocondria, Peroxisoma, Apoplasto	H_2O_2 , O_2^{\bullet}	Asada (1999); Noctor & Foyer (1998)
Glutatión	Cloroplasto, Citosol, Mitocondria, Peroxisoma, Apoplasto	H_2O_2	Asada (1999); Noctor & Foyer (1998)
α-tocoferol	Membranas	ROOH, O_2^{\bullet}	Asada & Takahashi (1987)
Carotenoides	Cloroplastos	O_2^{\bullet}	Asada & Takahashi (1987)

Tabla II. Sistemas antioxidantes en plantas (adaptado de Mittler, 2002)

1.6 Importancia de los antioxidantes no enzimáticos en la dieta de humanos

Las EAO están relacionadas con numerosas enfermedades entre ellas los desórdenes neurodegenerativos, como son la isquemia y el envejecimiento en los humanos.

Numerosas patologías humanas son debidas a una baja calidad de la dieta. Entre los nutrientes importantes que deben ser incorporados a través de una apropiada alimentación se encuentran los aminoácidos, ácidos grasos esenciales, minerales, hidratos de carbono y vitaminas. Se recomienda la ingestión de vegetales como una variada y rica fuente de estos nutrientes. Si bien muchos de ellos se necesitan en

cantidades mínimas para evitar ciertos trastornos fisiológicos, se ha verificado en ciertos casos que la incorporación de mayores dosis de vitaminas previenen el desarrollo de muchas enfermedades, especialmente a través del consumo de productos vegetales que las contienen en altas cantidades (Foyer & Fletcher, 2001).

De acuerdo a estudios llevados a cabo por Wang *et al.* (2005), se ha demostrado que la incorporación a la dieta de vegetales que tienen alto contenido de antioxidantes como las frambuesas, espinacas, frutillas y espirulina ha mejorado las capacidades motoras y ha reducido los daños celulares ocasionados por casos de isquemia en animales de laboratorio (Joseph *et al.*, 1998). Sin embargo en el caso de la vitamina A, una alta concentración en la dieta puede producir ciertas reacciones adversas en pacientes con ciertas patologías (Daulaire *et al.*, 1992; Stephensen *et al.*, 1998)

Por otro lado, se ha demostrado que con la edad aumenta el deterioro celular por acción de las EAO, provocando daños como la lipoxidación, que puede ser causante de enfermedades degenerativas a nivel neuronal como es el Alzheimer (Finch & Cohen, 1997) o el mal de Parkinson (Jenner, 1996).

1.7 Importancia de la vitamina C

El nombre "ascórbico", dado comúnmente a la vitamina C, procede del prefijo α - (que significa "no") y de la palabra latina *scorbuticus* ("escorbuto"), una enfermedad causada por la deficiencia de vitamina C. Los primeros registros sobre el "escorbuto" datan de la civilización egipcia (Davey *et al.*, 2000). Sin embargo, no fue sino hasta 1907 cuando se diagnosticó fehacientemente que se trataba de una deficiencia en la dieta, tanto de humanos como de ciertos animales (Holst & Frölich, 1907). Su descubrimiento (Svent-Györgi, 1927) y el estudio de sus funciones (Svent-Györgi, 1928, Svent-Györgi, 1931) tuvieron que esperar dos décadas más para ser entendidos. Haworth (1932) descubre la estructura química del AA un año después. De esta manera, en 1933 el AA se convierte en la primera vitamina que pudo ser aislada en su forma cristalina (Svent-Györgi, 1933).

A partir de estos trabajos, en 1937 Walter Norman Haworth recibe el Premio Nobel de Química por su trabajo en la determinación de la estructura del ácido ascórbico (compartido con Paul Karrer, que recibió su premio por el trabajo con las

vitaminas). Y ese mismo año el premio de Fisiología y Medicina fue para Albert Svent-Györgi por sus estudios de las funciones biológicas del AA.

Un caso interesante en la evolución de las especies es la pérdida de la capacidad de síntesis del AA. Los anfibios y los reptiles, son capaces de sintetizar el AA en los riñones, mientras que unos pocos mamíferos lo producen en el hígado. Las especies más evolucionadas de aves y mamíferos han perdido dicha capacidad (Chatterjee, 1973). En humanos (*Homo sapiens sapiens*) esta incapacidad se encuentra asociada a una mutación en la secuencia que codifica para la L-gulono- γ -lactona oxidasa (Nishikimi *et al.*, 1994), la enzima encargada de la última etapa en la síntesis de AA en animales (Linster & Van Schaftingen, 2007). De esta manera, la única fuente de AA para los humanos la constituyen los vegetales que son incorporados a la dieta.

El AA o vitamina C interviene en la síntesis de colágeno y consecuentemente en la formación y mantenimiento de cartílagos, huesos, piel, etc. Debido a su actividad antioxidante existen fuertes evidencias que indican que posee efectos protectores contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (v.g. cáncer, envejecimiento, etc.) (Davey *et al.* 2000). Se ha reconocido que la actividad de leucocitos y otras funciones del sistema inmune son incrementados por el AA (Lee & Kader, 2000).

1.8 Importancia de la vitamina E

El término Vitamina E fue puesto por Sure en 1924 al denominar un factor desconocido de la fertilidad, en analogía con las vitaminas (A, B, C y D) que se habían descubierto hasta esa fecha (Sure, 1924). Debido a su importante función en la fertilidad de los animales, el grupo de sustancias que conforman la Vitamina E, se las denominó “*tocoferoles*”, del griego “*tocos*” que significa nacimiento y “*ferol*” del griego “llevar” (Evans *et al.*, 1936). Evans *et al.* (1936) descubrió que el aceite del embrión del trigo contenía diferentes formas de tocoferoles, de los cuales caracterizó con más detalle al α -tocoferol. Las otras formas de los tocoferoles (β , γ , δ) fueron aislados de otras fuentes vegetales (Evans *et al.*, 1936; Emerson *et al.*, 1937). La estructura de los tocoferoles fue dilucidada por Fernholz *et al.* (1938). Posteriormente, la identificación de un anillo croman-6-ol en todos los compuestos con actividad vitamínica llevó a la designación de “*tococromanoles*”, que incluía tanto a los tocoferoles como a los

tocotrienoles (Karrer *et al.* 1938; Scott *et al.* 1976).

Debido a sus características anfipáticas, los tococromanoles se insertan en la bicapa lipídica de las membranas celulares con la cabeza de cromanol hacia la fase acuosa y la cola embebida en la matriz no polar. En vegetales, los tococromanoles se han encontrado en cloroplastos y en plástidos de raíces, flores y frutos (Dörmann, 2007).

Los tococromanoles son antioxidantes que protegen a los aceites de la oxidación química de los dobles enlaces Cummings *et al.* (1931). La capacidad antioxidante en forma creciente es α -, β - y γ -tocoferol. La protección de los ácidos grasos insaturados se encuentra mediada por su capacidad de romper cadenas de peroxidación, debido a que los tocoferoles reaccionan con los radicales peroxilo previniendo la posterior oxidación de los dobles enlaces (Fryer 1992; Wolf 2005). La capacidad de reaccionar con el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) por medio de la transferencia de energía de resonancia constituye otra de las importantes funciones de los tocoferoles (Fryer, 1992). Es sabido que los tococromanoles pueden prevenir la oxidación de otros antioxidantes y *vice versa*; como es el caso del α -tocoferol y el β -caroteno reaccionando con el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) (Burton & Ingold, 1984).

Tanto el AA como el GSH en asociación con otros antioxidantes pueden volver a la forma α -tocoferol a los radicales α -tocoferoxilo en las membranas de los cloroplastos (Noctor & Foyer, 1998).

El efecto de la asociación con fosfolípidos de cadena simple o asimétrica determinaron que el α -tocoferol puede estabilizar membranas (Salgado *et al.*, 1993a, 1993b). También se ha propuesto que podría actuar como molécula de señalización intracelular, como regulador de la concentración de EAO en la célula, regulando el crecimiento, desarrollo y respuesta al estrés en los vegetales (Munné-Bosch & Alegre, 2002).

Con respecto a la dieta humana, se los ha vinculado a la protección contra enfermedades cardiovasculares, cánceres, desórdenes neurológicos, cataratas y su deficiencia produce una depresión del sistema inmune (Bramley *et al.*, 2000). También se lo ha relacionado con efectos beneficiosos en el tracto intestinal (Halliwell *et al.*, 2005).

1.9 Funciones del ácido ascórbico en plantas

El AA es el antioxidante soluble más abundante en células vegetales. Constituye un protector contra las EAO producidas por los procesos de fotosíntesis, fotorrespiración, y el transporte de electrones unido a membranas (Foyer *et al.*, 1994). El AA tiene una participación central de defensa celular cuando reacciona con EAO que aumentan sus niveles ante diferentes desórdenes ambientales como la sequía (Bartoli *et al.*, 2004; Tambussi *et al.*, 2000), la exposición a ozono (Conklin & Barth, 2004; Sharma & Davis, 1997) y al ataque de patógenos (Conklin & Barth, 2004) entre otros.

Las EAO son altamente tóxicas cuando se presentan en elevados niveles, pudiendo dañar proteínas, membranas y ADN, sin embargo, en bajas concentraciones actúan también como moléculas de señalización (Davletova *et al.*, 2005; Foyer & Noctor, 2005). Para que no produzca deterioro celular, las EAO deben ser controladas para prevenir la oxidación de diversos compuestos celulares, como también evitar daños funcionales y estructurales a las membranas (Smirnoff, 1996). Es sabido que altas concentraciones de AA se encuentran en cloroplastos, sugiriendo una importante función en proteger a las plantas de la fotooxidación (Smirnoff & Pallanca, 1996). El AA es el principal componente del ciclo propuesto por Halliwell & Foyer (1976), encontrándose involucrado en la protección del fotosistema II.

Además de su función como antioxidante, el AA es cofactor de varias enzimas en rutas metabólicas importantes y presenta funciones importantes en el control del crecimiento y el desarrollo (Pastori *et al.*, 2003). Ciertas dioxigenasas dependen del AA y se son las encargadas de la síntesis de flavonoides, como así también de hormonas como el ácido giberélico, el etileno y el ácido abscísico (Davey *et al.*, 2000; Smirnoff *et al.*, 2001). El AA es cofactor de las mono- y dioxigenasas que poseen cobre o hierro en el centro de reacción. La función del AA es la de mantener los centros de reacción de estas enzimas, donde se alojan estos metales de transición, en forma reducida (Arrigoni & De Tulio, 2002). El AA influye en la mitosis, en el crecimiento (Tabata *et al.*, 2001; Noctor & Foyer, 1998; Arrigoni & de Tullio, 2000; Smirnoff & Wheeler, 2000) y en la diferenciación celular (Alcain *et al.*, 1994; Cordoba & Gonzalez-Reyes, 1994; DeGara *et al.*, 1997; DeCabo *et al.*, 1993).

Bajas concentraciones de AA promueven la senescencia, mientras que altas

concentraciones la retrasan (Navabpour *et al.*, 2003). En un mutante deficiente en la producción de AA, *vtc1-1*, se produce la inducción de ciertos genes asociados a la senescencia (Barth *et al.*, 2004).

Además de todas estas funciones, al ser electronegativo, el AA puede donar fácilmente sus electrones. Por ejemplo, el AA está involucrado en la regeneración de la Vitamina E por medio de una reacción no enzimática. Se lo ha reportado como sustrato para la biosíntesis de oxalato (Kostman *et al.*, 2001) y tartrato en ciertas especies (Loewus, 1999).

1.10 Síntesis del ácido ascórbico en plantas

La biosíntesis del AA se produce a través de una compleja red interconectada, en los cuales la D-manosa-1-P, el mioinositol (Lorence *et al.*, 2004) y el ácido D-galacturónico son las principales vías de entrada (Leferink *et al.*, 2008; Valpuesta & Botella, 2004; Ishikawa *et al.*, 2006) (Figura I).

La vía de síntesis de AA de no-inversión fue propuesta por Wheeler *et al.* (1998), es la que más aporta al contenido de este antioxidante al metabolismo celular (Smirnoff *et al.*, 2001). Por lo tanto, a lo largo de esta tesis se hará hincapié en esta ruta. Esta vía incluye los pasos de oxidación del C1 dando 1,4-Lactona, una posterior oxidación en las posiciones C2 y C3 con una última epimerización en el C5 para dar la configuración L del AA (Loewus, 1999). Wheeler *et al.* (1998) han demostrado que el sustrato de la enzima L-galactona-1,4-lactona dehidrogenasa (GLDH) es la L-galactona-1,4-lactona (GL). Posteriormente se ha visto que el AA es sintetizado en la mitocondria (Bartoli *et al.*, 2000) a través de la oxidación de la L-galactona-1,4-lactona, la cual es catalizada por la GLDH. Esta reacción depende de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Bartoli *et al.*, 2000). En otro trabajo Dowdle *et al.* (2007) demostraron que el bloqueo de la síntesis de AA a partir de mutantes knockout de GDP-D-manosa (Figura I) produce plantas inviables de *Arabidopsis thaliana*, que no sobreviven si no son suplementadas con AA en forma exógena.

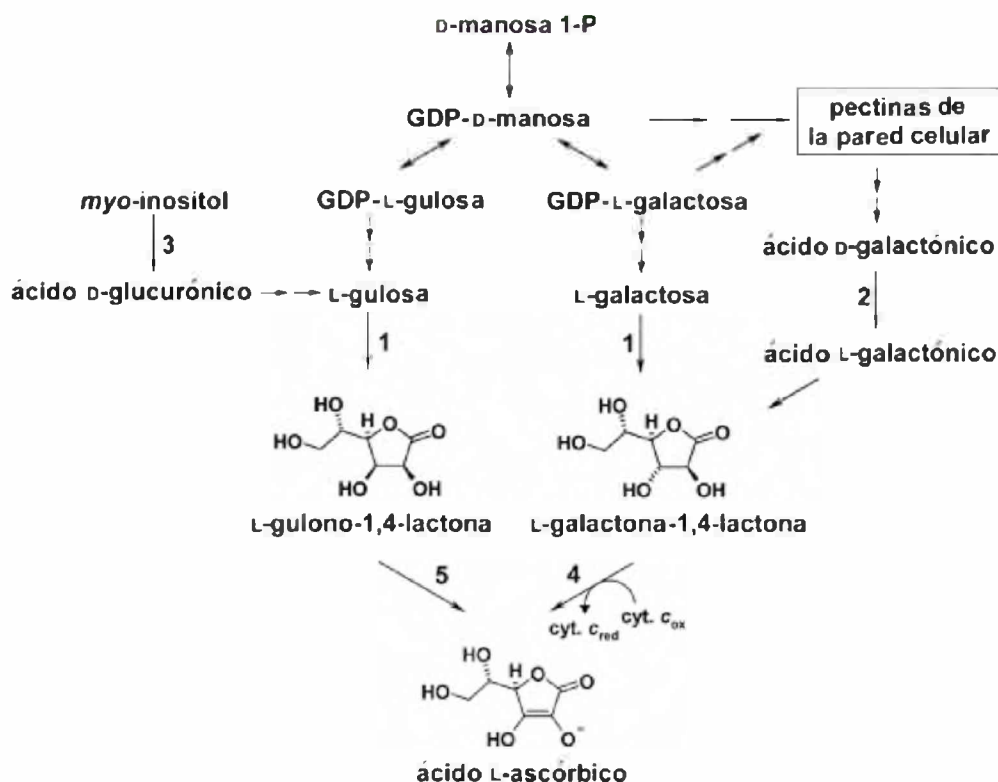


Figura I. Vías de síntesis de AA propuestas en plantas (1) L-galactosa deshidrogenada, (2) D-galacturonato deshidrogenada, (3) mioinositol oxigenasa, (4) GLDH, (5) GLDH o una L-gulono-1,4-lactona oxigenasa o una L-gulono-1,4-lactona deshidrogenasa desconocida (traducido de Leferink *et al.*, 2008)

La GLDH es parte del complejo mitocondrial I en los vegetales (Heazlewood *et al.*, 2003) y desde un principio se supuso que estaría asociada al brazo de la membrana, quedando expuesta hacia el espacio intermembrana de las mitocondrias de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Heazlewood *et al.*, 2003; Millar *et al.*, 2003). En una revisión posterior Klodmann *et al.* (2010) demostraron que se encuentra asociada al brazo periférico del complejo I de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Figura II). Hallazgos recientes también estarían indicando que la GLDH podría llegar a constituir un factor de ensamblaje del complejo I y del armado de la superestructura proteica (Pineau *et al.*, 2008).

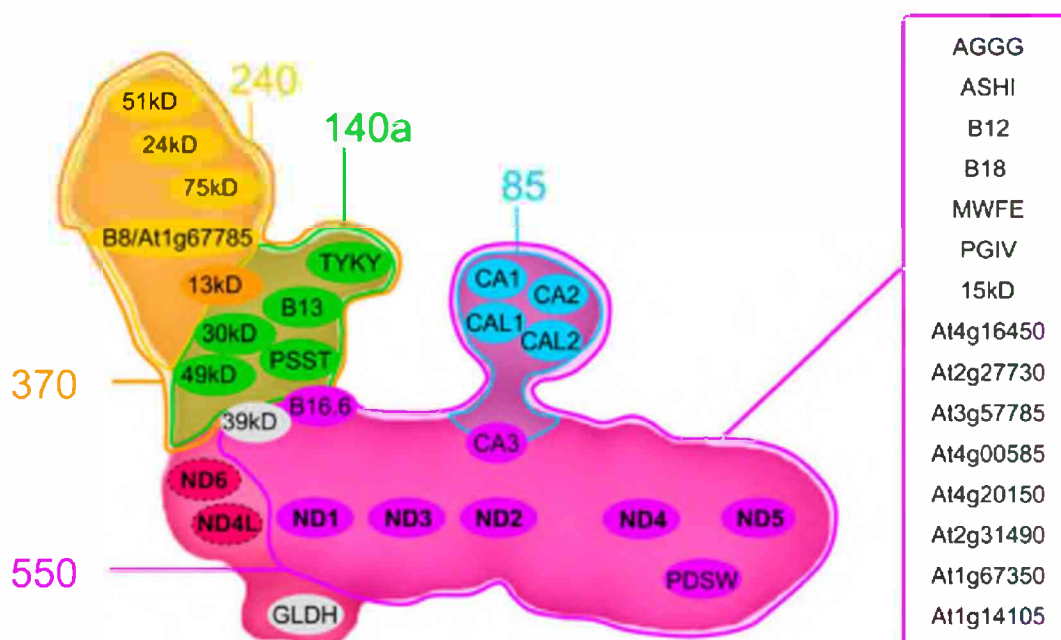


Figura II. Modelo interno de la arquitectura del complejo mitocondrial I de *Arabidopsis thaliana* (Klodmann *et al.*, 2010)

Dentro de los antioxidantes solubles más importantes presentes en células vegetales se pueden mencionar a los compuestos fenólicos (Balasundram *et al.*, 2006), el AA y el GSH, encontrándose estos dos últimos en los cloroplastos. Los frutos tienen un poder antioxidante mucho más elevado que el de las hortalizas (Vinson *et al.*, 1998, 2001), debido a una mayor cantidad y calidad de los compuestos fenólicos que poseen (Vinson *et al.*, 2001). También se ha visto un sinergismo en el poder antioxidante cuando varios de estos compuestos se encuentran combinados en jugos de frutas (Vinson *et al.*, 2001), como es el caso del AA junto con los fenoles (Miller & Rice-Evans, 1997).

A pesar de que el AA y el GSH actúan sobre las EAO separadamente, funcionan en conjunto en el ciclo del AA-GSH (Foyer & Halliwell, 1976) (Figura V) y en el ciclo agua-agua (Asada, 1999) para metabolizar el H_2O_2 y disipar los excesos de energía producidos en los cloroplastos (Foyer & Shigeoka, 2011). En las células vegetales, el sustrato más importante para la reducción del H_2O_2 es el AA (Melhorn *et al.*, 1996). La APX utiliza dos moléculas de AA (Figura IIIa) para reducir al H_2O_2 a H_2O , con la generación de dos moléculas de MDHA (Figuras IIIb y V). El MDHA es un radical de corta vida, que si no es rápidamente reducido, se dismuta a AA y DHA (Figura IIIc). En la célula el MDHA puede ser reducido directamente a AA, pudiendo ser el dador de electrones el citocromo *b* (Horemans *et al.*, 1994), la ferredoxina en su forma reducida (Miyake & Asada, 1992) o

el NAD(P)H (Asada, 1997). La última reducción es catalizada por la MDHAR (Asada, 1997); sin embargo puede haber una generación no enzimática de AA y DHA a partir del MDHA, como así también una producción de DHA a partir de la oxidación del AA. El DHA (Figura IIIc) puede ser reducido a AA en una reacción catalizada por la DHAR y utilizando al GSH como dador de electrones (Figura IVa; Foyer & Halliwell, 1977). Esta reducción produce GSSG (Figura IVb), el cual es reducido nuevamente a GSH en una reacción catalizada por la GR, utilizando como poder reductor al NADPH (Figura V) (Ishikawa & Shigeoka, 2008).

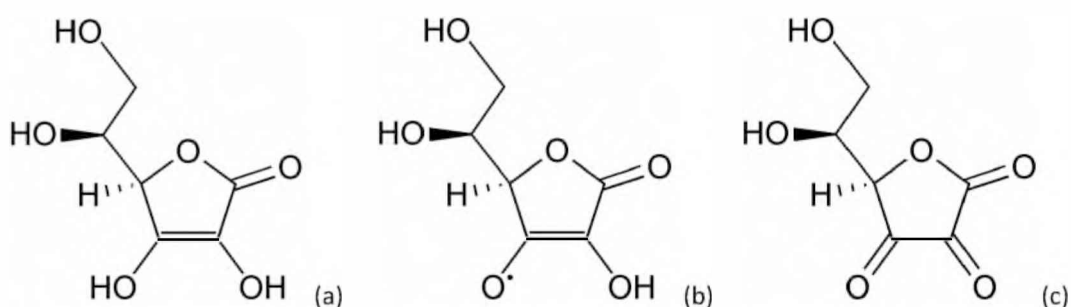


Figura III. Representación esquemática de los ácidos ascórbico (a), monodehidroascórbico (b) y dehidroascórbico (c).

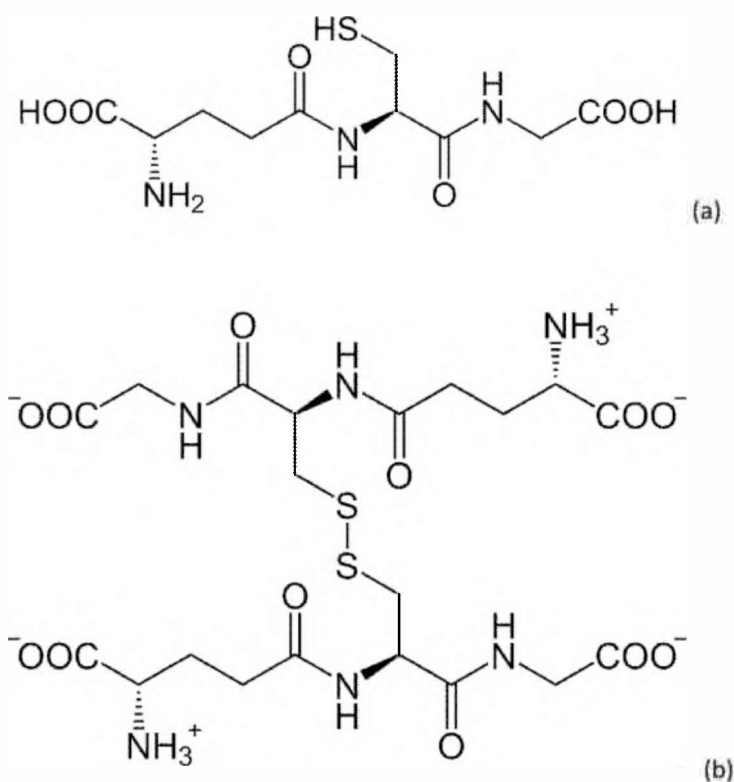


Figura IV. Representación esquemática de GSH (a) y GSSG (b)

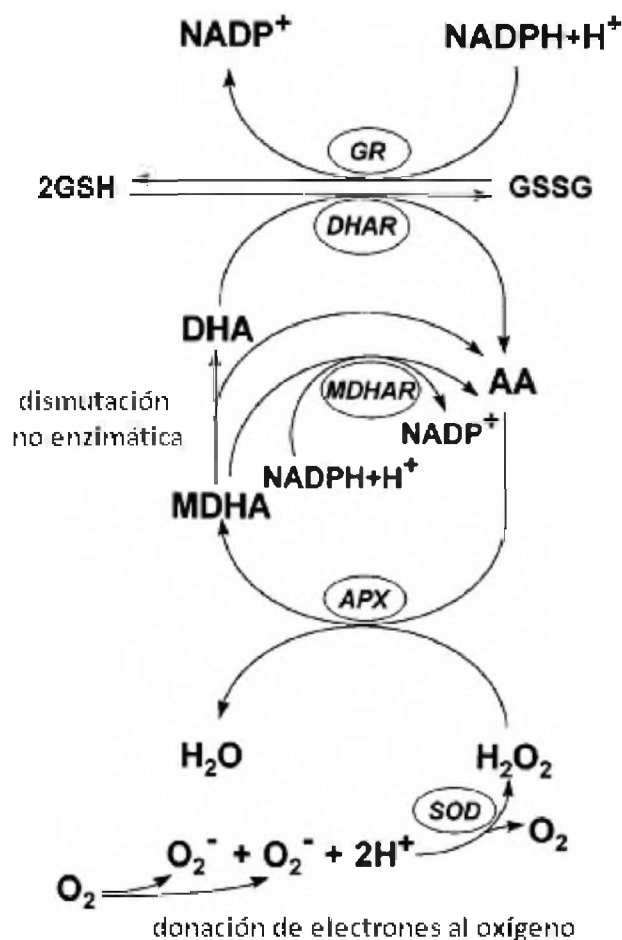


Figura V. Ciclo del AA-GSH. No todas las reacciones están estequiométricamente balanceadas (traducido de Noctor & Foyer, 1998)

1.11 Funciones y vía de síntesis del glutatión

El GSH se puede encontrar en una gran cantidad de procariotas y eucariotas, representando la mayor fuente no proteica de azufre reducido (Kunert & Foyer, 1993). La forma reducida del GSH es un tripéptido cuya fórmula abreviada es γ -glu-cis-gli (Figura IVa), el cual puede ser oxidado a glutatión disulfuro (Figura IVb). El GSSG puede ser nuevamente reducido a GSH utilizando NADPH por medio de la enzima glutatión reductasa (Noctor & Foyer, 1998).

En las plantas, el GSH cumple dos funciones importantes en el metabolismo del azufre y formando parte de las defensas antioxidantes de las células. Se ha probado que el GSH regula la absorción del azufre a nivel de las raíces (Herschbach & Rennenberg, 1994; Lappartient & Touraine, 1997). Se ha demostrado que podría actuar

sobre la regulación génica (Baier and Dietz, 1997) como precursor de fitoquelantes que se pueden unir a metales pesados (Grill et al., 1987, 1989) y como sustrato de las glutatión S-transferasas, las cuales conjugan el GSH con sustancias xenobióticas potencialmente peligrosas, como los herbicidas (Marrs, 1996). Se lo ha asociado a la regulación del sistema redox en la división celular (Sanchez-Fernández *et al.*, 1997), como así también es un importante antioxidante (Miao *et al.*, 2006), actuando en situaciones de estrés (Noctor *et al.*, 1998).

La biosíntesis del GSH se produce a partir de dos reacciones dependientes del ATP, catalizadas por la γ -glutamilcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa, las cuales forman γ -glutamilcisteína y GSH, respectivamente (Meister, 1988) (Figura VI). Los aminoácidos que conforman el GSH provienen de diferentes vías. El glutámico proviene de la asimilación del nitrógeno (Lea & Miflin, 2003), la cisteína a partir de la asimilación del azufre (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Saito, 2000; Kopriva, 2005, Noctor *et al.*, 1998), mientras que la glicina puede provenir de la fotorespiración por la vía del glicolato (Buwalda *et al.*, 1990; Zelitch, 1972), o por medio de la serina (Mouillon *et al.*, 1999).

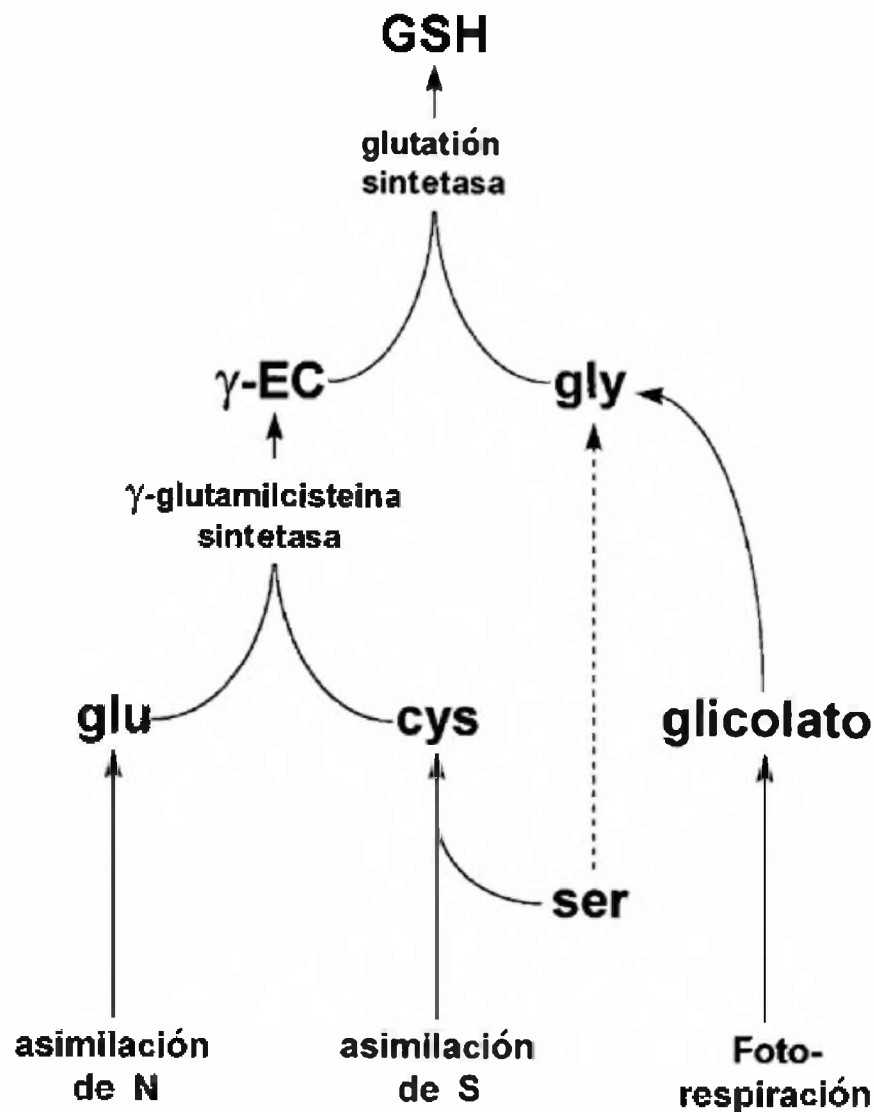


Figura VI. Biosíntesis de GSH a partir de sus aminoácidos constituyentes (traducido de Noctor & Foyer, 1998)

1.12 Vía de síntesis de los tocoferoles

Los tocoferoles pueden ser solamente sintetizados por organismos fotoautotróficos, incluyendo a las plantas y a otros organismos fotosintéticos (DellaPena & Pogson, 2006). A pesar de que la vía de síntesis fue dilucidada en 1979 (Soll & Schultz, 1979), recién en la década de 1990 fueron descubiertos todos los pasos clave en su síntesis.

La síntesis se produce en los plástidos de las plantas superiores, utilizando a las vías del siquimato y del fitil-difosfato como recursos (Figura VII) (Rohmer, 2003; DellaPenna, 2005a; DellaPenna, 2005b). Los primeros tocoferoles en sintetizarse son el

γ - tocoferol (Figura VIIIb) y el δ -tocoferol (Porfirova *et al.*, 2002), que por medio de la acción de la enzima γ -tocoferol metil transferasa se produce α -tocoferol (Figura VIIIa) y β - tocoferol, respectivamente (Figura VII) (Shintani & DellaPenna, 1998).

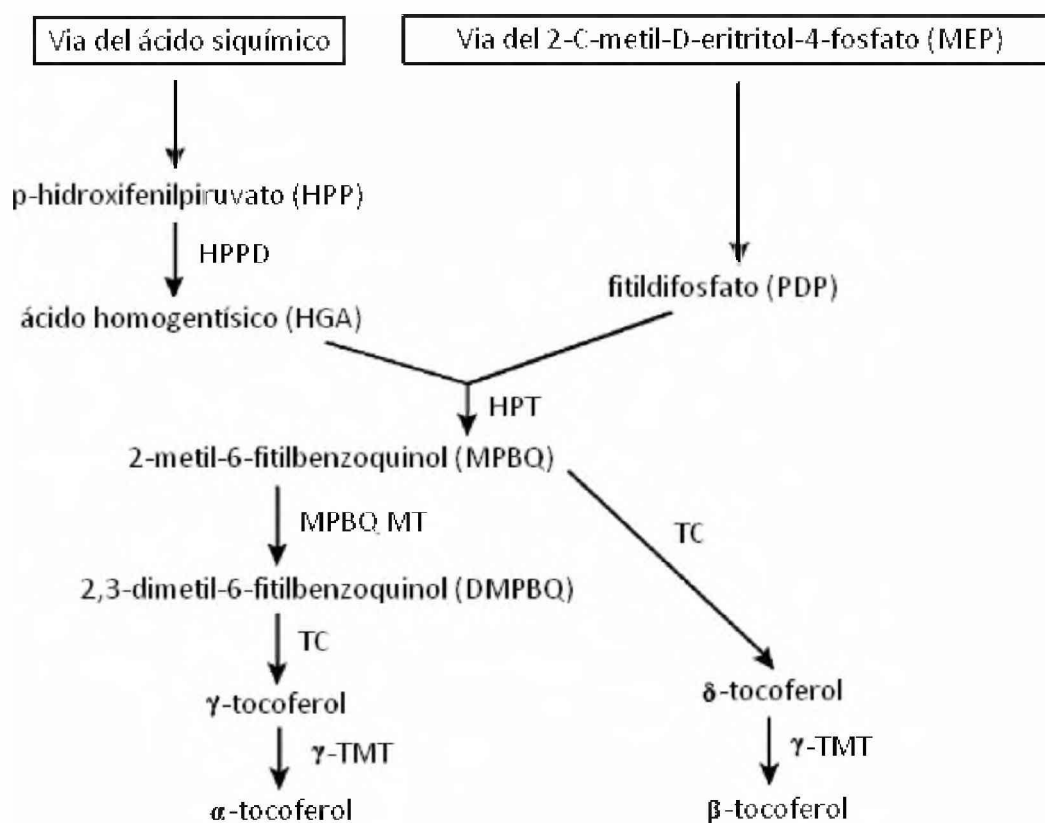


Figura VII. Esquema simplificado de la biosíntesis de tocoferoles a partir del ácido siquímico y del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (traducido de Li *et al.*, 2010)

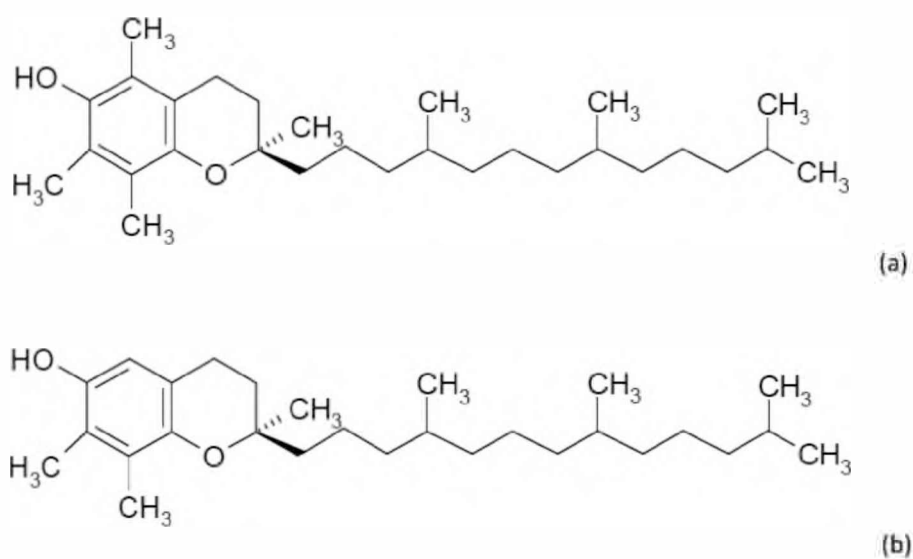


Figura VIII. Representación esquemática del α -tocoferol (a) y del γ -tocoferol (b).

1.13 Condiciones para la comercialización de espinaca

De acuerdo al Código Alimentario Argentino (1969), las hortalizas frescas deberán ser “sanas y limpias”; “entendiéndose por sana la que está libre de enfermedades criptogámicas o de lesiones de origen físico, químico o biológico o atacadas por microorganismos o insectos; y limpia la que está libre de insectos, ácaros o cualquier sustancia extraña adherida” (Ley 18.284 - Capítulo XI – Artículos 822 y 869). Por otro lado, la espinaca para consumo en fresco deberá además contar con un corte neto en su base, sin deshilachado, ni presentar tallo florífero, ni sabores ni olores extraños (Resolución RX 297 83).

1.14 Vinculación entre el etileno, EAO y la acumulación de antioxidantes

El desarrollo foliar consta de diferentes etapas que consisten en una división celular en la superficie del ápice, formándose de esta manera el primordio foliar; en la segunda etapa se produce una expansión que determinará la forma de la hoja dependiendo de la dirección con que se dividan las células; y la cuando la hoja llega al 50 u 80% de su tamaño final detiene el proceso de división celular para luego continuar creciendo (Salisbury y Ross, 1992a). Finalmente, la última etapa del desarrollo foliar es conocida como senescencia.

La senescencia de las hojas se caracteriza por una pérdida en el contenido de clorofila y una declinación de la fotosíntesis (Hensel *et al.*, 1993). Asimismo, es sabido que durante este proceso tiene lugar una pérdida de la capacidad antioxidante y un incremento de los niveles de EAO (Barth *et al.*, 2006). De acuerdo con la “teoría del envejecimiento por especies activas del oxígeno” (Harman, 1956), puede decirse que la disminución en los niveles de antioxidantes pueden dar como resultado una elevada producción de EAO generando un estrés oxidativo. Como consecuencia, el desbalance entre oxidantes/antioxidantes produce daños en el aparato fotosintético, llevando a una rápida declinación en la actividad fotosintética, y por lo tanto acelerar la senescencia. Las células comienzan a peroxidar los lípidos, se produce una degradación

del ADN en el núcleo, como así también de las membranas, y las vacuolas comienzan a desintegrarse. (Barth *et al.*, 2006). Alternativamente, el balance entre oxidantes/antioxidantes podría estar regulado hormonalmente en los tejidos vegetales y de esta manera participar controladamente del desarrollo de los tejidos foliares.

Las EAO podrían ser las señales que desencadenan la síntesis y acumulación de antioxidantes (y otras respuestas) en tejidos vegetales. Estos niveles incrementados de EAO por modificaciones exógenas podrían constituir una señal que desencadenaría la acumulación protectora de antioxidantes (Mach *et al.*, 2004). El etileno es una hormona que regula el desarrollo de las plantas. Esta hormona podría desencadenar la senescencia a través de un desbalance entre los niveles de EAO y de antioxidantes (Matto *et al.*, 1986; Lamb & Dixon, 1997; De Jong *et al.*, 2002). Sin embargo, ***aun no se ha establecido si el etileno produce un aumento de EAO, disminución de antioxidantes o ambos simultáneamente.***

Dentro de las fitohormonas estudiadas, se sabe que el etileno, el ácido absísico (ABA), el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) promueven la senescencia, mientras que el ácido giberélico (GA) la inhibe. Hay evidencia que vincula a dichas fitohormonas con procesos asociados a la senescencia y al contenido de AA (Barth *et al.*, 2006). Sin embargo Barth *et al.* (2006) no mencionan una relación entre la senescencia, los antioxidantes y etileno en conjunto.

1.15 Vía de síntesis del etileno

El etileno en las plantas superiores es sintetizado por la siguiente vía: L-metionina → S-adenosil-L-metionina (AdoMet) → ácido L-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) → etileno (Adams & Yang, 1979). Dos enzimas son específicas de dicha cadena de reacción y son la ACC sintetasa y la ACC oxidasa (Kende, 1989, 1993), las cuales catalizan la conversión de metionina a ACC y de ACC a etileno, respectivamente (Yang & Hoffman, 1984; Imaseki, 1991; Kende, 1993). La ACC sintetasa, además de producir ACC, produce S-metiltioadenosina, que es utilizada en la síntesis de nueva metionina (Figura IX). Esto hace posible que altas tasas de biosíntesis de etileno puedan ser mantenidas, aún cuando la cantidad de metionina en el medio es pequeña (Bürstenbinder *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2002; Kende, 1993).

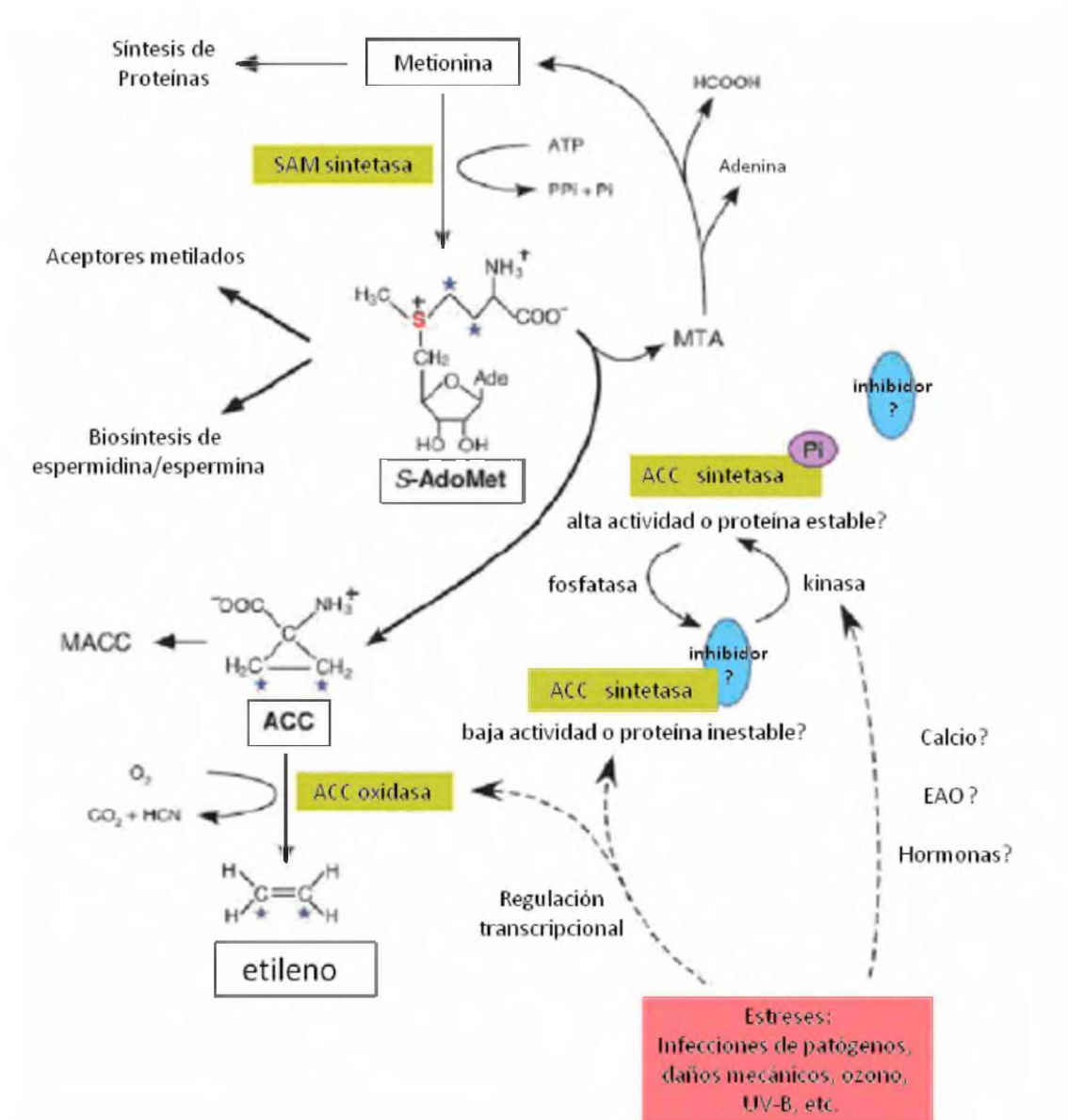


Figura IX. Biosíntesis y regulación del etileno (traducido de Wang *et al.*, 2002)

La ACC sintetasa y la ACC oxidasa se encuentran reguladas y se expresan en respuesta a diversos efectos inductores como son el etileno, auxinas, daños mecánicos (O'Donnell *et al.*, 1996), daños producidos por patógenos (Lund *et al.*, 1998; Hase *et al.*, 2003), por altas (Field, 1981a) y bajas temperaturas (Field, 1981b; Tomaszewski *et al.*, 1994) o iones metálicos como Cd^{2+} (Fuhrer, 1982) y Li^+ (Yang & Hoffman, 1984; Abeles *et al.*, 1992; Theologis, 1992). Es posible que la ACC sintetasa sea la enzima que limite la tasa de síntesis desde que es estimulada (Yang & Hoffman, 1984) y juega una función importante en la regulación de la producción de etileno (Yu *et al.*, 1979; Yang & Hoffman, 1984; Mattoo & White, 1991; Kende, 1993). Sin embargo, existen evidencias

en algunos casos que indican que la actividad de la ACC oxidasa también se incrementa en algunos tejidos vegetales en respuesta a factores internos o externos que inducen a la producción de etileno (Ye & Dilley, 1992; Kende, 1993; Mathooko, 1996).

1.16 Señalización por medio de receptores de etileno

Muchos componentes claves en la señalización del etileno pueden ser identificados a partir de una simple prueba genética en la cual se ponen a germinar semillas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh en la oscuridad, demostrando un comportamiento denominado “triple respuesta”. La triple respuesta se encuentra caracterizada por la inhibición de la elongación del hipocótilo y de la radícula, el hipocótilo es más grueso y el gancho plumular presenta una curvatura exagerada. Muchas poblaciones de *A. thaliana* han sido identificadas a partir de la detección del fenotipo de la triple respuesta. Los mutantes han sido identificados también en la ausencia de etileno (Chen *et al.*, 2005).

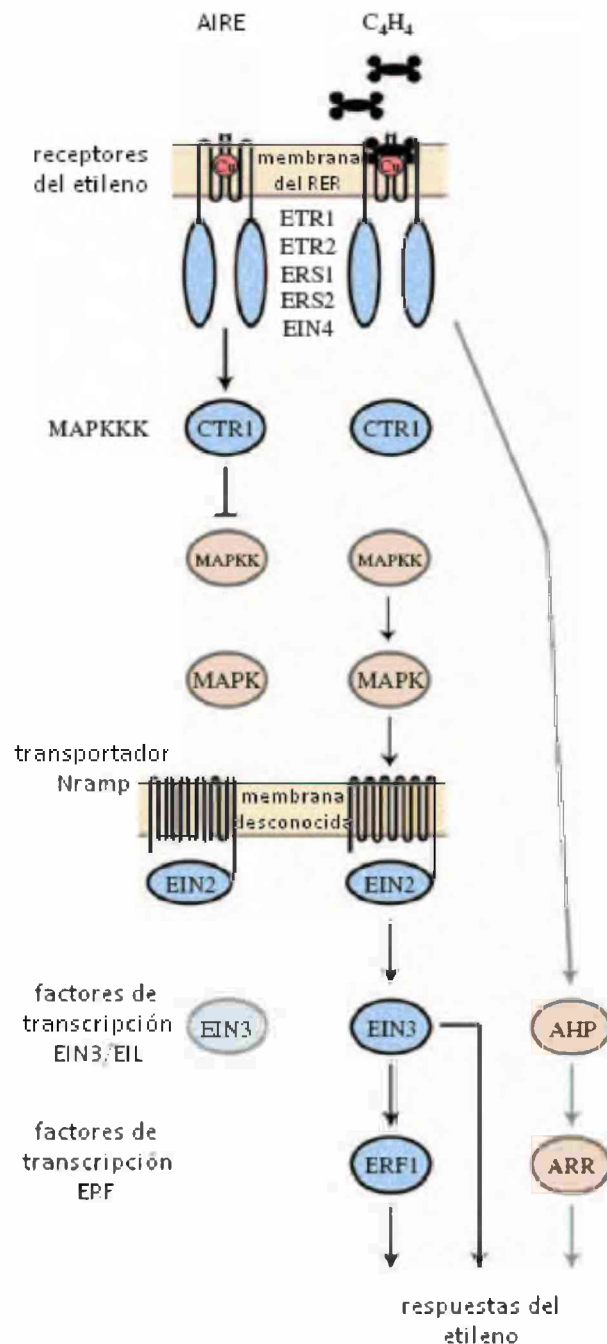


Figura X. Modelo de transducción de la señal de etileno que incorpora los aspectos bioquímicos de los componentes de la cadena (traducido de Wang *et al.*, 2005).

El etileno es percibido por una familia de receptores que se encuentran unidos a la membrana del retículo endoplasmático (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4). (Chen *et al.*, 2005). Análisis filogenéticos y de secuenciación dividen a estos receptores en dos subfamilias. Los miembros de la subfamilia I tienen una actividad histidina-kinasa, mientras que los miembros de la otra subfamilia carecen de dicha actividad y potencialmente tienen una actividad serina-kinasa. ETR1 y ERS1 pertenecen a la

Subfamilia I. Ambos receptores tienen un dominio amino terminal en el cual se une el etileno y otro con actividad histidina - kinasa. ETR2, ERS2 y EIN4 pertenecen a la subfamilia II. Éstos tres receptores tienen un dominio amino terminal al cual se une el etileno y otro dominio degenerado con actividad histidina - kinasa que carece de uno o más elementos que son necesarios para la actividad catalítica (Figura X) (Etheridge *et al.* 2006; Gou & Ecker, 2004)

El etileno se une a éstos receptores por medio del cobre que actúa como cofactor. El cobre es probablemente llevado por el transportador de cobre denominado RAN1 (Gou & Ecker, 2004).

En ausencia de etileno, los receptores se encuentran en la forma funcionalmente activa. La pérdida de función de todos los receptores produce un efecto de respuesta constitutiva al etileno, indicando que los receptores son reguladores negativos de la acción del etileno (Hua & Meyerowitz, 1998).

La pérdida de la función por una mutación en el gen dominante de cada uno de éstos receptores individualmente no tiene efecto sobre el crecimiento de las plantas, lo que indica que hay una redundancia en la función de los mismos (Chen *et al.*, 2005; Gou & Ecker, 2004). También se ha observado la respuesta constitutiva al etileno en los que se presentan mutados los receptores ETR1 y ERS1, cuando también se encuentra mutado RAN1. En estos mutantes dobles se han observado fenotipos MYRIAD, incluyendo defectos en el desarrollo de órganos florales, infertilidad, una roseta extremadamente compacta y una floración tardía. Estos síntomas se presentan de una manera más severa en los mutantes CTR1. Éstos defectos son completamente suprimidos en la presencia de una mutación en el gen EIN2, lo que indica que existe una relación entre éste y los anteriormente mencionados (Gou & Ecker, 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, gran parte del reconocimiento y señalización debido al etileno ocurre en el retículo endoplasmático (RE). ETR1 se encuentra asociado al RE, como así también CTR1 ha sido encontrado en el mismo sitio. CTR1 se encuentra compuesto por un dominio amino terminal cuya función es desconocida y un dominio en el extremo carboxílico con actividad kinasa que es la más relacionada a Raf-like mitogen-activated protein kinase (MAPK) y MAPK kinasa kinasa (MAPKKK).

El dominio amino terminal de CTR1 puede interactuar con los dominios histidina

kinasa de ETR1 y ERS1. Debido a que CTR1 no tiene un dominio transmembrana, es posible que su localización en el RE sea debida a su interacción con los receptores. CTR1 también puede asociarse a los receptores de la subfamilia II, pero lo hace con poca afinidad. Esto demuestra que los receptores de la subfamilia I son esenciales para la señalización del etileno (Gou & Ecker, 2004).

1.17 Factores primarios de transcripción

La regulación transcripcional del etileno se encuentra controlada por seis miembros de la familia EIN3, de los cuales EIN3 y EIL3 son las dos proteínas más relacionadas. Los mutantes EIN3 y EIL3 presentan una insensibilidad incompleta ante el etileno, los mutantes dobles muestran una insensibilidad total al etileno, incluyendo la triple respuesta (Gou & Ecker, 2004).

1.18 Inhibidores de la acción del etileno

Dentro del grupo de inhibidores de la acción del etileno, podemos mencionar a: dióxido de carbono, tiosulfato de plata (STS) (Cameron & Reid, 1981), aminoetoxivinilglicina (AVG) (Aharoni & Lieberman, 1979), 2,5-norbornadieno (2,5-NBD) (Sisler *et al.*, 1985) y diazociclopentadieno (DACP) (Sisler & Blankenship, 1993).

Sin embargo el 1-metilciclopropeno (1-MCP) se ha presentado como el más efectivo, logrando los mismos resultados que otros inhibidores, pero a menores concentraciones (Blankenship & Dole, 2003).

El 1-MCP bloquea la acción del etileno, a través de una unión irreversible al receptor de dicha hormona (Sisler & Serek, 1997). Se ha determinado que el efecto del 1-MCP depende del tiempo de exposición, la temperatura, la concentración de dicho inhibidor, el método de aplicación, el estado de desarrollo o de madurez del órgano a tratar, el tiempo desde la cosecha hasta que se realiza el tratamiento y el número de aplicaciones.

En 1999 la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency) aprueba el 1-MCP para el uso en ornamentales bajo el nombre comercial de EthylBloc®. Hasta la fecha, los ensayos llevados a cabo sobre

esta sustancia han sido favorables. Debido a la baja concentración de aplicación, a la ausencia de acción tóxica y a que es un compuesto similar a los naturales, lo hacen ambientalmente seguro (Blankenship & Dole, 2003).

1.19 Efecto de la luz sobre el contenido de antioxidantes

Dentro de los factores de postcosecha mencionados por Lee & Kader (2000), no se considera a la luz como modulador de la concentración y síntesis de AA, sino que sólo se hace una mención a la luz UV como agente desinfectante.

1.20 Efecto de la luz como factor de morfogénesis y modulador de la acumulación de antioxidantes

Los efectos oxidativos de la luz contra la defensa de las plantas han sido estudiados desde el punto de vista del estrés que causan, sin embargo, poco es conocido sobre la relación de los antioxidantes no enzimáticos y su marcha en los ritmos circadianos. A partir de los resultados llevados a cabo por Kiyota *et al.* (2006), se ha demostrado que plantas de espinaca sometidas a oscuridad continua, mantienen los mismos ciclos de AA a lo largo del día y que podrían estar acoplados al ritmo de radiación UV-C.

Toledo *et al.* (2003) realizaron experiencias con tratamientos de luz sobre hojas jóvenes y maduras de espinaca. Utilizaron tubos de luz fluorescente con una intensidad de 20 a 25 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en forma continua por el término de 24 días a 8 °C. Estos autores encontraron que el contenido de AA se mantenía en niveles mayores en las hojas tratadas, respecto de las mantenidas en la oscuridad, y por otro lado, que tienen siempre mayores contenidos de AA las hojas jóvenes. No se detectaron diferencias en el contenido DHA en las hojas jóvenes, pero si se vio una disminución de la proporción DHA/AA en las hojas maduras tratadas con luz. Si se vieron mayores contenido de de carbohidratos totales y de glucosa en hojas tratadas, detectándose un aumento significativo a los 24 d. El autor postula que el aumento en el contenido de los carbohidratos puede haber sido debido a un mantenimiento de la fotosíntesis por la luz

aplicada durante el experimento, y que los azúcares pudieron haber servido de fuente para la síntesis de AA, habiendo una relación positiva entre ambos. Sin embargo un punto no mencionado por Toledo *et al.* (2003) es qué pasaría si se aplicaran breves pulsos de luz de baja irradiancia que reemplacen el efecto de fotosíntesis para descartar la vía de acumulación o mantenimiento de carbohidratos.

Por otro lado se ha demostrado que el contenido de AA se ve incrementado en plantas sometidas a altas irradiancias (Bartoli *et al.*, 2006). En plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn con L-galactosa deshidrogenasa antisentido, se observó un aumento del contenido de GL ante condiciones de alta intensidad lumínica, indicando que la síntesis es llevada a cabo a partir de GDP-manosa. Por otro lado las peroxidasas se ven aumentadas en los mutantes con baja producción de AA (Gatzek *et al.*, 2002).

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

El etileno controla el contenido y estado redox de los antioxidantes durante el desarrollo afectando la generación de EAO durante la senescencia foliar. Por otro lado, la luz de baja irradiancia en cortos pulsos actúa como modulador del contenido de antioxidantes.

2.2 Objetivo general

El **objetivo general** de esta tesis consiste en determinar los factores que controlan la calidad alimenticia (v.g. contenido de vitaminas o antioxidantes) de hojas de espinaca durante su almacenaje en postcosecha.

2.2.1 Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Determinar la cronología de eventos que se producen en etapas tempranas de la senescencia de hojas jóvenes y maduras de espinaca.

Se determinará el efecto de la oscuridad sobre:

- a. El contenido de clorofila, F_v/F_m y la fuga solutos.
- b. La tasa de formación *in vivo* de H_2O_2 , la actividad de CAT, APXm, APXc y el contenido de MDA.

Objetivo específico 2: Determinar el papel del etileno y del 1-MCP en la acumulación, el estado redox y las vías de síntesis y recuperación de las formas reducidas de antioxidantes en hojas jóvenes y maduras de espinacas.

Se determinará el efecto de aplicaciones de etileno y de 1-MCP en:

- a. El contenido de AA, GSH y α -y γ -tocoferol.
- b. El estado redox del AA y GSH.
- c. La actividad de GLDH, MDHAR y DHAR.
- d. La tasa de formación *in vivo* de H_2O_2 , la actividad de CAT y el contenido de MDA.

Objetivo específico 3: Determinar la regulación ejercida por el etileno sobre el contenido de antioxidantes hidro y liposolubles en mutantes insensibles y de respuesta constitutiva al etileno de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Se determinará en mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh insensibles (*ein2-1*, *ein3-1* y *ein4*) y de respuesta constitutiva al etileno (*ctr1-1*), almacenados en oscuridad los siguientes parámetros:

- Parámetros de senescencia.
- La acumulación de AA, GSH y α -y γ -tocoferol.
- El estado redox de AA y GSH.
- La actividad de GLDH, MDHAR y DHAR.
- La tasa de formación *in vivo* de H_2O_2 y la actividad de CAT, como parámetros de estrés oxidativo.

Objetivo específico 4: Determinar el efecto de pulsos de luz de baja intensidad sobre la acumulación de antioxidantes hidrosolubles (AA y GSH) y liposolubles (α - y γ -tocoferoles)

Se estudiará el efecto de pulsos cortos de luz a diferentes frecuencias y duraciones sobre:

- Los parámetros de senescencia de hojas maduras de espinaca (Contenido de clorofila, fuga de solutos y F_v/F_m).
- El contenido de antioxidantes hidro- (AA y GSH) y liposolubles (α -y γ -tocoferol) en hojas maduras de espinaca.
- La capacidad de recuperación de las formas oxidadas del AA, por medio de la determinación de las actividades de MDHAR y DHAR.

Objetivo específico 5: Determinar el efecto de pulsos de luz de baja intensidad en combinación con 1-MCP y refrigeración sobre el contenido de antioxidantes hidrosolubles (AA y GSH) y liposolubles (α - y γ -tocoferoles)

Se estudiará el efecto de pulsos cortos de luz de baja intensidad en combinación con 1-MCP y refrigeración sobre:

- Los parámetros de senescencia de hojas maduras de espinaca (Contenido de clorofila, fuga de solutos y F_v/F_m).
- Parámetros de estrés oxidativo (Liberación *in vivo* de H_2O_2 y actividad catalasa)

- c. El contenido de antioxidantes hidro- (AA y GSH) y liposolubles (α - y γ -tocoferol) en hojas maduras de espinaca.
- d. La capacidad *in vivo* de síntesis de AA.
- e. La capacidad de recuperación de las formas oxidadas del AA, por medio de la determinación de las actividades de MDHAR y DHAR.

3. Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Material Vegetal

Para los distintos tratamientos se utilizaron hojas maduras y jóvenes de *Spinacia oleracea* L. cultivar BISON de la empresa Rijk Zwaan (Nueva Zelanda) que fueron cultivadas en la Estación Experimental Julio A. Hirschorn, dependiente de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (Universidad Nacional de La Plata), ubicada en la Localidad de Los Hornos, Partido de La Plata (34° 55' LS y 57° 57' LW). Las espinacas fueron cultivadas bajo invernáculo y el agua y nutrientes fueron dosificados mediante riego por goteo (Figuras 1 y 2). Las siembras se realizaron desde el 15 de marzo hasta el 1 de julio a intervalos de 15 días en los años 2007, 2008, 2009, 2010 y 2011. Cuando las plantas se encontraban en condiciones de cosecha, se separaron hojas totalmente expandidas, denominadas de ahora en más “hojas maduras” y hojas de los tres primeros verticilos, denominadas “hojas jóvenes”.



Figura 1. Plantas de espinaca a un mes de la siembra creciendo en los invernáculos de la Estación Experimental Julio A. Hirschorn, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP). Se puede observar el detalle de las cintas de riego por goteo.



Figura 2. Plantas de espinaca a dos meses de haber sido sembradas. En este estado se encontraban listas para ser cosechadas.

Las hojas fueron almacenadas en bolsas de polietileno cerradas para evitar su deshidratación y transportadas inmediatamente al laboratorio para realizar los tratamientos y las determinaciones de diversos parámetros.

Otros experimentos fueron realizados con *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Las semillas de los mutantes insensibles al etileno (*ein2-1*, *ein3-1* y *ein4*) y el mutante de triple respuesta al etileno (*ctr1-1*) junto con las plantas silvestres (background Columbia) fueron obtenidas del The Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University - United States). Las semillas fueron sembradas en macetas de 150 cm³ de capacidad conteniendo una mezcla de tierra y vermiculita en partes iguales. Las plantas crecieron en una cámara a 23 °C con 100 μ moles de fotones m⁻² seg⁻¹ por el término de dos meses con un fotoperíodo de 10/14 h luz/oscuridad.

3.2 Tratamientos

3.2.1 Etefón

Las hojas jóvenes y maduras recién cosechadas fueron puestas en una solución de 200 ppm de ácido cloroetilfosfórico a partir de una solución stock al 48 % (p/v), comercialmente conocido como “Etefón” y 0,1 % v/v de dimetil sulfóxido utilizado como surfactante (“DMSO”) por el término de 20 min. Las hojas no tratadas fueron puestas en la misma solución por el mismo término de tiempo, pero sin la adición de etefón. Una vez finalizados los tratamientos, las hojas fueron secadas cuidadosamente con toallas de papel absorbente y puestas en bolsas de polietileno. Las hojas fueron almacenadas en oscuridad a 23 °C. Se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 h de realizado el tratamiento.

3.2.2 1-MCP (Smart Fresh™)

Una vez cosechadas, las hojas se colocaron en una cámara de vidrio hermética de 40 L de capacidad, donde fueron tratadas con una concentración de 0,0; 0,1 y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP (Smart Fresh™). Para llegar a dichas concentraciones de 1-MCP dentro de la cámara, se utilizaron 0, 5 y 50 mg de un complejo de 1-MCP con γ -ciclodextrina que en presencia de agua destilada libera el gas (Watkins, 2006). El complejo de 1-MCP con γ -ciclodextrina se dispuso en un vaso de precipitado suspendido y una vez sellada la cuba se agregaron 25 ml de agua destilada mediante una jeringa, como se ve en la Figura 3. Las hojas se incubaron por 6 h y luego se guardaron en bolsas de polietileno de baja densidad en oscuridad. Las hojas no tratadas fueron sometidas al mismo tratamiento, pero sin la adición de 1-MCP (Figura 6). Para los tratamientos realizados a 23 °C, las muestras fueron tomadas a los 3 y 6 d (Gergoff *et al.*, 2010b).

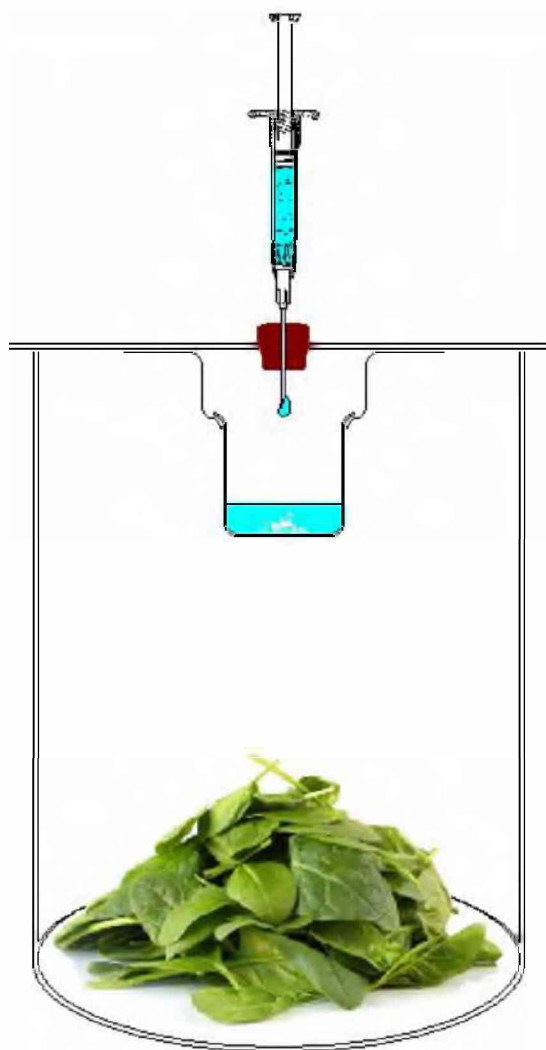


Figura 3. Diagrama de aplicación de 1-MCP sobre hojas de espinaca en cámara hermética.

A su vez, también se realizaron tratamientos con 0,0; 0,1 y 1.0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP y las hojas fueron mantenidas a la oscuridad a 4 °C, tomando las muestras semanalmente por el término de un mes.

3.2.3 Pulsos de luz

De la misma manera que con los tratamientos anteriores, las hojas cosechadas fueron puestas en bolsas de polietileno de baja densidad y fueron llevadas a cámara a 23 °C donde se garantizó la total hermeticidad contra la luz exterior. En este caso se utilizaron solamente hojas maduras. Las hojas fueron sometidas a pulsos de luz a una irradiancia correspondiente al punto de compensación lumínico por tres días con distintas frecuencias y duraciones, que se resumen a continuación:

- Hojas iluminadas en todo el limbo
 - Pulsos de 15 min de duración cada 2 h (3 h de fotoperíodo en total).
 - Pulsos de 15 min de duración cada 6 h (1,5 h de fotoperíodo en total).
 - Pulsos de 7 min de duración cada 2 h (1,4 h de fotoperíodo en total).
- Hojas iluminadas en un hemilimbo
 - Pulsos de 15 min de duración cada 6 h (1,5 h de fotoperíodo en total). Las hojas fueron tapadas con papel aluminio respetando la nervadura central como se puede ver en la Figura 4.

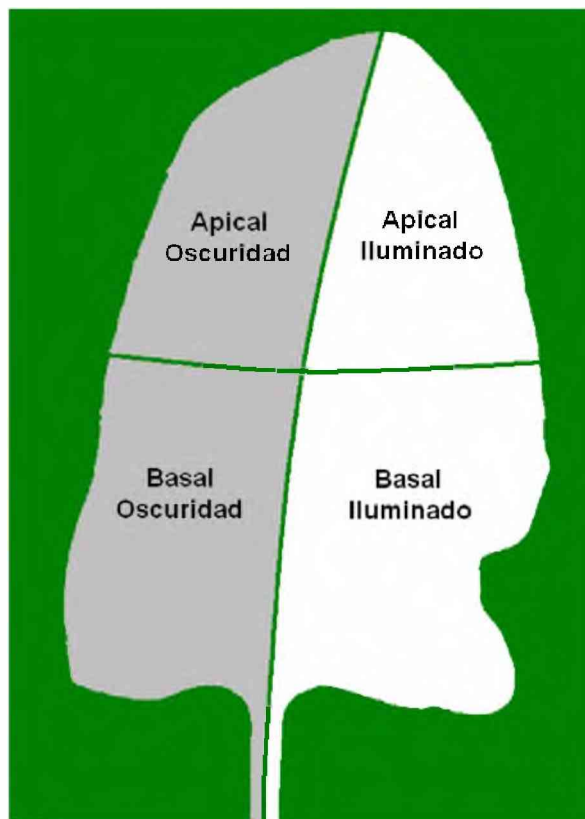


Figura 4. Zonas de tratamiento de hojas maduras de espinaca iluminadas en un solo hemilimbo.

Las hojas no tratadas fueron puestas en las mismas condiciones, pero en bolsas oscuras para evitar la filtración de luz. Se utilizaron para los tratamientos tubos fluorescentes de 18 Watts (OSRAM modelo L18 W/765 Basic Daylight 1050 lm). Una vez finalizados los tratamientos con luz, se tomaron las muestras. Las hojas restantes fueron llevadas a cámara oscura a 4 °C y al término de una semana se tomaron muestras.

De la misma manera se procedió con las hojas iluminadas en un solo hemilimbo. Se utilizó papel de aluminio para evitar la filtración de luz en una de las mitades de las hojas.

3.2.4 Tratamientos a hojas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Se cosecharon hojas maduras de plantas de un mes de edad y se las guardó en bolsas de polietileno de baja densidad por el término de 3 d en cámara oscura a 23 °C. Las muestras se tomaron al momento de corte y al finalizar el tratamiento en oscuridad.

3.3 Parámetros determinados

3.3.1 Fuga de solutos

La fuga de solutos se realizó de acuerdo con Gomez *et al.* (2008). Para la determinación de fuga de solutos se partió de material fresco. Se utilizó agua ultrapura para todas las determinaciones. Se cortaron 5 discos de 1 cm de diámetro por hoja muestreada, que pesaban en conjunto 150 mg aproximadamente. En un vaso de precipitado se colocaron los discos previamente pesados y se agregaron 20 ml de agua ultrapura. Se los llevó al agitador a 100 rpm por 15 minutos. Se descartó el agua y se volvieron a agregar otros 20 ml de agua. De esta manera se determinó lo que denominaremos “conductividad inicial” (CI). Luego los vasos fueron llevados nuevamente al agitador por el término de 3 horas. Transcurrido este tiempo se midió nuevamente la conductividad, que en este caso denominaremos “conductividad final” (CF). Las muestras luego son hervidas por 5 min en una platina caliente. Se esperó a que las muestras se enfriaran y se las volvió a llevar a su volumen inicial. De esta manera determinamos la “conductividad máxima” (CM). Por medio de la Fórmula 1 determinamos el porcentaje de fuga de solutos:

$$\frac{(CF - CI)}{(CM - CI)} \times 100 \times g^{-1} PF = \% \text{ pérdida de solutos } g^{-1} PF$$

Fórmula 1. Determinación del porcentaje de pérdida de solutos.

3.3.2 Contenido de clorofila

El contenido de clorofila se determinó por medio de un medidor de clorofila (Minolta Chlorophyll Meter Spad 502 - Minolta Co. Ltd., Japan), a través de unidades de verdor arbitrarias. Se utilizó este método de acuerdo a indicaciones de Martínez & Guiamet (2004).

3.3.3 Rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (F_v/F_m)

Después de cada tratamiento, para la determinación del rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (F_v/F_m), se pusieron las hojas en completa oscuridad por 30 min. Transcurrido este tiempo, se procedió a la determinación por medio de un sistema de fluorescencia modulada (FMS2, Hansatech Instruments, Ltd., Norfolk, UK). Los parámetros fueron calculados de acuerdo con Genty *et al.* (1989).

3.3.4 Contenido de proteína soluble

El método utilizado para la determinación del contenido de proteína soluble fue desarrollado por Bradford (1976). Se utilizó para la extracción un buffer 0,1 M bicina, 1mM EDTA, 10 % Glicerol, 0,1 % Triton X-100 (J.T.Baker® X198-07) y llevado a pH 7,5 con NaOH. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a - 80 °C. Se emplearon dos ml de buffer por cada g de PF de muestra para realizar los homogenatos. Se utilizaron 750 µl por cada 10 discos de hojas de espinaca (entre 350 y 400 mg de PF aproximadamente). Se agregó al buffer de homogeneización cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich® - P8340). Luego se centrifugó a 16000 x g por

10 min, se descartó el pellet y se utilizó para la medición el sobrenadante. El reactivo de Bradford consistió en Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma® B-113) 0,01% (p/v), etanol 4,7% (v/v) y ácido ortofosfórico 8,5% (v/v). Para la determinación se utilizó una proporción 95:5 reactivo:sobrenadante. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente y se determinó el contenido de proteína por espectrofotometría a $\lambda = 595$ nm. Como patrón se utilizó BSA.

3.3.5 Contenido de ácido ascórbico y dehidroascórbico

La técnica corresponde a la utilizada por Gomez *et al.* (2008). Las muestras (discos de hojas) fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C . Al momento de la determinación se procesaron en nitrógeno líquido con mortero y pilón hasta formar un polvo. Se utilizaron 200 mg de PF de muestra aproximadamente para homogeneizarlas en 1 ml de TFA 3 % (v/v). Se centrifugaron a 16000 xg por 10 min. Se sembraron en columnas de elución (Eluted Bond C18 VARIAN™) previamente equilibrada con buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.

Para la determinación de ácido ascórbico total (AAT) se realizó una mezcla al 50 % del eluyente de las columnas con una solución 100 mM K_2HPO_4 y el agregado posterior de 3 mM DTT. Luego de incubar 5 min a temperatura ambiente se agregó un 10 % de TFA al 3 % (v/v) para re-acidificar el medio. Las muestras se filtraron y se inyectaron en el HPLC. Para la determinación de ácido ascórbico reducido en lugar de DTT se agregó agua. El buffer de corrida consistió en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 3. La longitud de onda utilizada para la determinación fue de $\lambda = 265$ nm (Shimadzu Co. UV-VIS Detector SPV-10AV, Japan). Por diferencia entre el contenido de AAT y AA se obtuvo el contenido de DHA.

3.3.6 Contenido de glutatión reducido y oxidado

La determinación de glutatión se realizó de acuerdo con Griffith (1980) con mínimas modificaciones. La concentración de glutatión se determinó en extractos ácidos solubles usando un ensayo cinético en el cual se cuantifica la reducción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) por NADPH a 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) de

acuerdo a las siguientes reacciones (Tietze, 1969).



La ecuación (1) es de naturaleza no enzimática, mientras que la ecuación (2) está catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR). Esta reacción se puede ver esquemáticamente en la Figura 5.

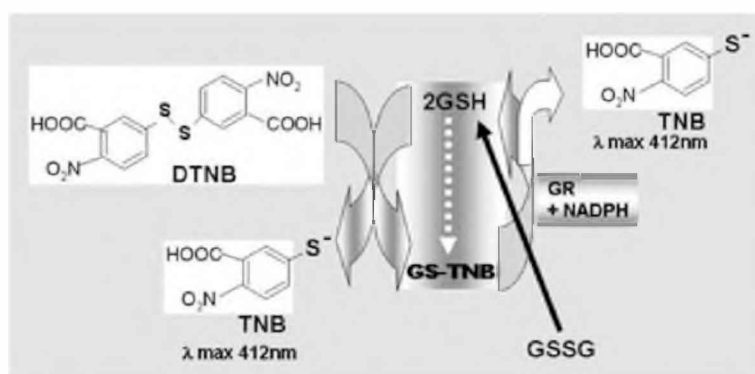


Figura 5. El GSH reacciona con el DTNB para formar TNB y el aducto GS-TNB. El GS-TNB junto con el GSSG es luego reducido a GSH por acción de la GR. El TNB formado puede ser cuantificado espectrofotométricamente a $\lambda=412$ nm (Rahman *et al.*, 2007).

Las muestras previamente congeladas en nitrógeno líquido se procesaron con mortero y pilón hasta formar un polvo. Las muestras tenían aproximadamente 200 mg de PF, a las que se les agregó 1 ml de TFA 3 % (v/v). Luego de una centrifugación a 16.000 xg por 10 min se conservó el sobrenadante para determinar glutatión.

La mezcla de reacción consistió en 100 mM buffer fosfato de potasio pH 7,5, EDTA 5 mM, DTNB 0,5 mM, NADPH 0,2 mM y glutatión reductasa (GR) 0,5 U/ml. Por cada ml de solución final se agregaron 15 μ l a 50 μ l de sobrenadante en medio ácido. La formación del TNB fue seguida espectrofotométricamente a una longitud de onda de $\lambda = 412$ nm (Roberts & Francetic, 1993).

Para la determinación de la concentración de glutatión se realizó un patrón con GSSG en el rango de concentraciones de las muestras.

Para cuantificar la forma oxidada solamente (GSSG), por cada 100 μl de muestra se le adicionaron 2 μl de vinilpiridina 95 % (v/v), se vortexeó vigorosamente y se dejó a 25 °C por el término de 20 min. Se centrifugó a 16000 xg por el término de 5 min y se tomó el sobrenadante para cuantificar espectrofotométricamente el contenido de GSSG (Griffith, 1980).

3.3.7 Determinación de Malondialdehído (MDA)

Se determinó por HPLC de acuerdo a Templar *et al.* (1999) con mínimas modificaciones.

Las muestras congeladas en nitrógeno líquido se procesaron con mortero y pilón hasta formar un polvo. Por cada 100 mg de tejido se agregaron 250 μl de buffer fosfato 50 mM pH 7,0, 25 μl de butilhidroxitolueno (BHT) 0,2 % (p/v) en etanol absoluto y 275 μl de ácido perclórico 6 % (v/v). Se vortexearon los homogenatos vigorosamente y se centrifugaron a 4000 xg por 10 min. Se tomaron dos volúmenes del sobrenadante y se les agregó 1 vol de ácido tiobarbitúrico 0,8 % (p/v). Se agitó vigorosamente por segunda vez y se incubó a 90 °C por el término de 45 min. La reacción consiste en la formación de un aducto, como se muestra en la Figura 6.

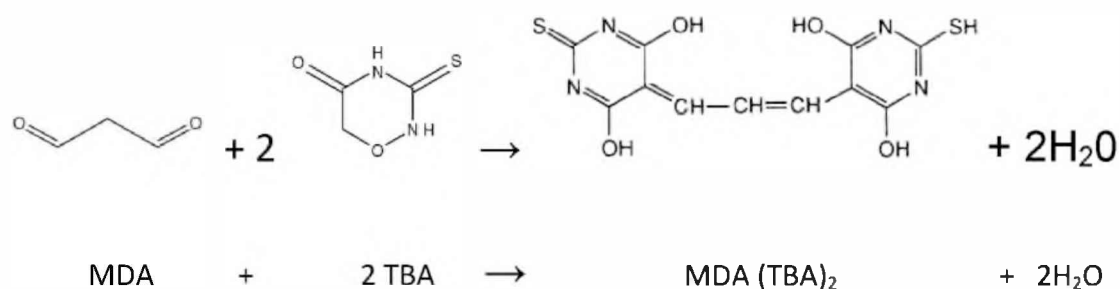


Figura 6. Reacción de formación del aducto a partir de la unión de TBA con MDA.

Una vez formada la coloración rojiza, se filtra e inyecta en el equipo de HPLC. El buffer de corrida consta de una mezcla 65:35 de buffer fosfato 50 mM pH 7,0 : metanol absoluto grado HPLC. La corrida de HPLC se realizó con un flujo de 1,2 ml min⁻¹ y se determinó la presencia del aducto entre el ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído a $\lambda = 532 \text{ nm}$ (Shimadzu Co. UV-VIS Detector SPV-10AV, Japan). A diferencia del resto de las determinaciones realizadas en el equipo de HPLC, las mediciones de MDA se

realizaron con la columna SUPELCOSIL™ LC-18 - 25 cm. x 4,6 mm., 5 µm (SUPELCO – USA).

Como patrón para la determinación de la concentración de MDA se utilizó de 1,1,3,3-tetrametoxipropano grado analítico. Para la preparación de las diferentes concentraciones de los estándares se utilizaron 100 µl de H₂O, 10 µl de BHT 0,2 % (p/v) en solución etanólica, 125 µl de ácido perclórico 6 % (v/v), 110 µl de TBA 0,8% y un volumen conocido de 1,1,3,3-tetrametoxipropano para lograr un rango de concentraciones cercano al de las muestras. Se vortexearon fuertemente las muestras y se las incubó a 90 °C por 45 min. Pasado ese tiempo, se filtraron los patrones y se inyectaron en el equipo de HPLC para su determinación.

3.3.8 Determinación de α - y γ -Tocoferol

La extracción se realiza por medio de metanol grado HPLC en una proporción de 10:1 metanol:g PF de la muestra, de acuerdo con Gomez *et al.* (2008).

Se centrifugó a 4000 xg por 10 min. Se tomaron 500 µl del sobrenadante y se mezclaron con 700 µl de n-hexano grado HPLC. Se agitó vigorosamente por 10 min, hasta que la fase de n-hexano tomó un color verde y la fase de metanol una coloración amarillenta. Se centrifugó a 4000 xg por 5 min para separar las fases. Se tomaron 600 µl de la fase de n-hexano y se evaporó en rotovapor. La muestra desecada se resuspendió en 100 µl de metanol HPLC y se sembró en una columna de elución (Eluted Bond C18 VARIAN™) previamente equilibrada con 2 ml de metanol. Se descartó el primer ml de elución y se conservaron los 2,5 ml siguientes que fueron evaporados en rotovapor. Se resuspendió en 150 µl de metanol grado HPLC y se filtró para inyectarlo en el HPLC. El buffer de corrida consistió en una solución de 95:5 metanol-agua. Las muestras y los patrones de α - y γ -Tocoferol se midieron a una longitud de onda de $\lambda = 292$ nm (Shimadzu Co. UV-VIS Detector SPV-10AV, Japan).

3.3.9 Liberación de peróxido de hidrógeno *in vivo*

Se determinó la concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) liberado al medio a partir de la técnica utilizada por Zhou *et al.* (1997), realizando las determinaciones por

medio de un espectrofotómetro. La reacción consistió en la oxidación enzimática del N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex® Red – Molecular Probes® A22188) en presencia de H_2O_2 y de la peroxidasa del nabo (HRP del inglés *Horse-Radish Peroxidase*), dando un producto coloreado que es factible de ser medido espectrofotométricamente. Este producto de oxidación es estable a pH 7,4. La ausencia de H_2O_2 o de HRP en el medio de reacción hace que el Amplex Red se conserve incoloro.

Como material vegetal se utilizaron 5 discos de hojas de 3 mm de diámetro, que pesaban en conjunto aproximadamente 20 mg. La solución de reacción consistió en un buffer TRIS – HCl 50 mM pH 7,4, Amplex Red 50 μ M y HRP 0,02 U/ml. Se midió la aparición de una coloración rojiza a una longitud de onda $\lambda = 560$ nm al cabo de 3 h de agitación. Concentraciones conocidas de H_2O_2 , reaccionaron de la misma manera que las muestras de hojas para realizar la curva de calibración.

3.3.10 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

Discos de hojas se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C. Las muestras se homogenizaron con mortero y pilón en hielo, en un buffer bicina-NaOH 0,1 M pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM y glicerol 10 %. La proporción ml de buffer:g PF de muestra fue de 2:1. Se agregó al buffer de homogeneización cóctel de inhibidores de fosfatasas y proteasas para plantas (Sigma-Aldrich® P9599) como se mencionó antes. Se centrifugaron las muestras a 4000 xg por 10 min para luego obtener el sobrenadante que se fraccionó, congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su posterior utilización.

3.3.11 Actividad *in vitro* de monodehidroascorbato reductasa

La técnica utilizada fue de acuerdo con De Gara *et al.* (2000). La mezcla de reacción consistió en buffer TRIS-HCl 50 mM pH 7,8, ácido ascórbico 2 mM, ascorbato oxidasa (Cantidad necesaria para provocar una variación de absorbancia entre 0,01 min⁻¹ y 0,02 min⁻¹ a $\lambda = 265$ nm por consumo de AA), NADH 0,1 mM y 25-50 μ l de muestra por cada ml de reacción. Se midió la actividad por la desaparición de NADH a $\lambda = 340$

nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$) (De Gara *et al.*, 2000).

3.3.12 Actividad *in vitro* de dehidroascorbato reductasa

La técnica se realizó de acuerdo con (De Gara *et al.*, 2000). La mezcla de reacción consistió en buffer de fosfatos 50 mM pH 6,5, EDTA 1mM dehidroascorbato 0,2 mM, GSH 2,5 mM y 12,5 μl de muestra por cada ml de medio de reacción. Se midió la aparición de ácido ascórbico a $\lambda = 265 \text{ nm}$ ($\epsilon_{\text{AA}} = 14 \text{ mM cm}^{-1}$) (De Gara *et al.*, 2000). Previo a las mediciones, el buffer fue burbujeado en N_2 por el término de 20 minutos para eliminar el oxígeno del medio de reacción. A su vez, la reducción no enzimática del DHA por el GSH fue descontada de la actividad real de la enzima en la muestra.

3.3.13 Actividad *in vitro* de catalasa

La mezcla de reacción consistió en buffer fosfato 50 mM pH 7,0, H_2O_2 12 mM y se inició la reacción con 20-50 μl de muestra por ml de mezcla. La actividad se determinó por la desaparición de H_2O_2 a $\lambda = 240 \text{ nm}$ ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} = 40 \text{ M cm}^{-1}$) (Aebi, 1984).

3.3.14 Actividad *in vitro* de ascobato peroxidasa fracción soluble y de membrana

La determinación de la actividad de las distintas fracciones de APX se determinaron de acuerdo con Amako *et al.* (1994). Se tomaron 150 mg de hojas congeladas en nitrógeno líquido y se le agregaron 400 μl de buffer fosfato 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, y ácido ascórbico 1 mM. Se las procesó con mortero y pilón en hielo y se las centrifugó a 4000 xg por 10 min. Se separó el sobrenadante que corresponde a la fracción que contiene ascobato peroxidasa soluble. El pellet resultante se resuspendió en un buffer fosfato 50 mM pH = 7, EDTA 1 mM, y AA 0,5 mM y se homogeneizó agitando. Este homogenato se lleva a centrifuga a 400 xg por 1 minuto. Se separa el sobrenadante y se lo centrifuga nuevamente a 16000 xg por el término de 10 minutos. El nuevo sobrenadante de esta fracción final corresponde a la ascobato peroxidasa

fijada a membranas.

La mezcla de reacción de las peroxidasas totales en cada fracción separada consistió de buffer fosfato 50 mM pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM, 10 ó 20 μ l de muestra por ml de mezcla de reacción y H_2O_2 1 mM. Para determinar la actividad de las ascorbato peroxidasas, se debió descontar la actividad del resto de las peroxidasas presentes en la muestra a la actividad de las peroxidasas totales. Para inhibir la actividad de las peroxidasas solubles y de membrana se agregó a la mezcla de reacción p-hidroximercuribenzoato (pCMB) 50 μ M en hidróxido de sodio 0,1 N. Para la determinación de la actividad de las peroxidasas se procedió de la misma manera que con las peroxidasas totales. La diferencia de actividad entre la peroxidasas totales y las inespecíficas da como resultado la actividad de la ascorbato peroxidasa en cada una de las fracciones separadas.

La actividad se determina monitoreando la desaparición del AA en la muestra a una longitud de onda de $\lambda = 265$ nm ($\epsilon_{\text{AA}} = 2,8$ mM/cm).

3.3.15 Actividad de L-galactona-1,4-lactona deshidrogenasa *in vitro*

Aproximadamente 300 mg de discos de hojas congeladas en nitrógeno líquido son macerados con mortero y pilón con 13 ml de un buffer MOPS-KOH 30 mM pH 7,5, manitol 350 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,2 % (p/v), cisteína 5,4 mM y PVPP (insoluble) 1% (p/v). Se centrifugaron a 3.000 xg por el término de 5 min a 4 °C. Se separaron 12 ml del sobrenadante y se le agregaron 1,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en permanente agitación refrigerando con hielo por el término de 30 min. La solución resultante se centrifugó nuevamente a 10.000 xg por 20 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 0,4 ml de un buffer MOPS 20 mM pH 7,2, manitol 300 mM y EDTA 1 mM. Para eliminar el exceso salino, se pasaron las muestras por una columna conteniendo Sephadex G-25. Se sembraron los 0,4 ml de muestra, se descartaron los primeros 0,5 ml de buffer de lavado y se tomaron los 2,5 ml siguientes para su medición. Los primeros 0,5 ml de buffer corresponden al volumen muerto de la columna de Sephadex G-25, mientras que en los 2,5 ml siguientes se encuentra la mayor concentración de GLDH (Bartoli *et al.*, 2000).

Para la determinación de la actividad de la GLDH, se realizó la siguiente mezcla de reacción: buffer TRIS-HCl 50 mM pH 8, citocromo *c* oxidado 0,1 mM, tritón 0,1 % (v/v) y de L-galactona-1,4-lactona 1 mM y 10 ó 15 μ l de muestra por cada 1 ml de solución final. Se mide la reducción de citocromo *c* a una longitud de onda $\lambda = 550$ nm (Bartoli *et al.*, 2000).

3.3.16 Actividad de L-galactona-1,4-lactona deshidrogenasa *in vivo*

Discos de hojas frescas (150 mg PF aproximadamente) fueron colocados en vasos de precipitado conteniendo 20 ml de una solución de GL 10 mM o agua ultrapura. Se los dejó agitando a 100 rpm por 3 h y finalmente las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y almacenadas a - 80 °C hasta su posterior medición de ácido ascórbico por HPLC para determinar la producción de AA *in vivo* durante el tiempo transcurrido en la incubación con GL (Bartoli *et al.*, 2000).

3.3.17 Determinación de punto de compensación lumínico en hojas de espinaca

Se utilizaron para la determinación de punto de compensación lumínico hojas maduras de plantas intactas de espinaca (*Spinacia oleracea* cv. Bison), las cuales fueron sometidas a diferentes intensidades lumínicas en forma decreciente (299, 203, 145, 99, 65, 42 y 3 μ moles de fotones $m^{-2} \text{ seg}^{-1}$) por medio una cámara conectada a un medidor portable de fotosíntesis (Portable Photosynthesis System CIRAS 2, PP Systems, USA) a una temperatura constante de 30 °C de acuerdo con Maydup *et al.*, 2010. A partir de una curva de calibración se determinó cuál es la irradiancia en donde las hojas de espinaca producen un intercambio neto de CO₂ igual a cero (Salisbury & Ross, 1992b)

3.3.18 Determinación de la producción de Etileno

La producción de etileno fue medida incubando hojas en frascos de vidrio

cerrados herméticamente. Luego de 1 h de incubación se tomó una muestra de 1 ml de del espacio de cabeza con jeringa a través de un tapón de goma para inyectarla en un cromatógrafo de gases (KNK-3000-HRGC Gas Chromatograph – Konik Instruments®, España), equipado con una columna de alúmina (Kromxpek A-220-8A 2m x 1/8”) y detector de ionización de llama (Bartoli *et al.*, 1996).

3.3.19 Determinación de la actividad respiratoria

Se determinó el consumo de oxígeno en discos de hojas en fase gaseosa de acuerdo a lo descrito en Bartoli *et al.* (2006). Los discos de hojas fueron colocados en una cámara conteniendo un electrodo de oxígeno tipo Clark (LD2/3 Leaf Disc Electrode, Hansatech, UK) y el cambio de la concentración de oxígeno monitoreado durante 5-10 minutos posteriores al cierre de la cámara.

3.3.20 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los apartados anteriores se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía con un diseño completamente al azar. Se utilizó el test LSD (ANOVA $P \leq 0,05$).

4. Resultados y discusión

4.1 Capítulo I

4.1 Capítulo I

4.1.1 Caracterización de la senescencia en hojas jóvenes y maduras de espinaca durante la postcosecha temprana

La senescencia foliar se encuentra asociada a una serie de procesos, en los cuales está involucrada la degradación de proteínas, clorofila (Hodges & Forney, 2000), ácidos nucleicos (Buchanan-Wolaston, 1997) y membranas (Trippi & Thimann, 1983). La separación física de las hojas de la planta y su almacenamiento en oscuridad han demostrado que promueven y aceleran los síntomas de una temprana senescencia (Bartoli *et al.*, 1996, Philosoph-Hadas, *et al.*, 1991). A su vez la relación entre los potenciales oxidantes y antioxidantes en las hojas que se encuentran implicados en la dinámica de la senescencia han sido estudiados a nivel de enzimas antioxidantes (Kanasawa *et al.*, 2000), como así también la función que cumplen las EAO en este proceso (Hodges, 2003). Se ha visto que la peroxidación de lípidos junto con el potencial antioxidante se encuentran relacionados a la senescencia foliar (Kunert & Ederer, 1985).

Las hojas de espinaca aportan vitaminas A (Tang *et al.*, 2005), C (Gil *et al.*, 1999; Lee & Kader, 2000) y E (Bramley *et al.*, 2000) y minerales como magnesio (Kikunaga *et al.*, 1995), hierro (Zhang *et al.*, 1989) y calcio (Peterson *et al.*, 1992), brindando también proteínas y un bajo contenido de lípidos a la dieta. Poseen una alta tasa respiratoria, lo que las hace muy perecederas (Kader, 2002). Tienen una baja producción de etileno pero son muy susceptibles al mismo, lo cual se manifiesta a través del amarillamiento (López-Ayerra *et al.*, 1998) y pérdida de antioxidantes solubles (vitamina C, glutatión) (Hodges & Forney 2000) luego de tratamientos con esta hormona.

Por otra parte, el desencadenamiento de procesos de senescencia en los vegetales cortados está relacionado en gran medida a la producción de etileno en las superficies cortadas de la hoja. Durante el almacenamiento de hojas de espinaca se producen dos picos de producción de etileno (Philosoph-Hadas *et al.*, 1989). El primer pico de producción de etileno en respuesta al corte parece tener un rol importante

reduciendo la duración postcosecha de muchos vegetales (Philosoph-Hadas *et al.*, 1989). El etileno causa una marcada aceleración de todos los procesos de senescencia en hojas cortadas de espinaca (Hodges & Forney, 2000). Por otro lado, el segundo pico de producción se da durante la fase de senescencia de hojas de espinaca (Philosoph-Hadas *et al.*, 1991).

Entre los procesos degradativos, se pueden observar disminuciones en los contenidos de clorofila, proteínas y antioxidantes (Hodges y Forney, 2000), los cuales se encuentran bajo un fuerte control ambiental y hormonal (Ferrante & Francini, 2006). **Sin embargo, la secuencia o cronología de eventos que tienen lugar durante la senescencia no han sido aún establecidas.**

Teniendo en cuenta estos antecedentes en la senescencia foliar, como primer medida se procedió a estudiar la secuencia de los síntomas que se presentan inmediatamente después de que las hojas son separadas de la planta y como evolucionan en los primeros días. Para la determinación del progreso de la senescencia de hojas cortadas de espinaca se establecieron como parámetros a cuantificar el contenido de clorofila, el rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (F_v/F_m) y la integridad de membranas.

Uno de los síntomas de la senescencia en las hortalizas de hoja una vez cosechadas, es la pérdida del verdor debido a la degradación de la clorofila (Yamauchi *et al.*, 1991). En este caso, las hojas de espinaca, tanto jóvenes ($36,0 \pm 1,7$ unidades SPAD) como maduras ($35,1 \pm 1,4$ unidades SPAD) no mostraron diferencias significativas respecto del valor hallado al inicio del experimento (Figura 1.1). En ensayos de senescencia con espinaca, llevados a cabo de manera similar, se han encontrado pérdidas a los 7 d de almacenamiento en oscuridad de hasta un 10 % del contenido de clorofila inicial (Hodges & Forney, 2000). Tendencias similares fueron encontradas por Meir *et al.* (1995) en hojas de berro. Sin embargo los mismos autores determinaron que en hojas de apio la pérdida de clorofila al cabo de 3 d fue mucho mayor. Es posible que las diferencias encontradas en estos ensayos respecto de los presentados en esta tesis sean debido a la variedad de espinaca utilizada, como así también podría ser que la tasa de pérdida de clorofila se acelere después de transcurridos los 3 d que aquí se analizan. Por lo tanto, se puede suponer que las tasas de pérdida de clorofila son muy variables entre especies (Meir *et al.*, 1995) como así también entre variedades de una misma especie (Hodges & Forney, 2003).

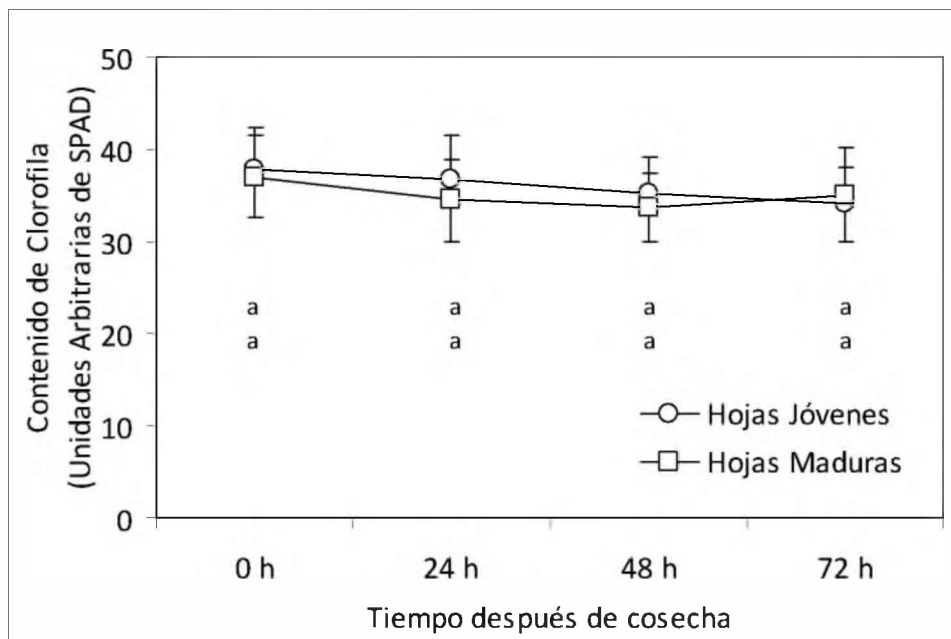


Figura 1.1 Contenido de clorofila expresado en unidades arbitrarias de SPAD en hojas jóvenes y maduras de espinaca a las 0,24, 48 y 72 h de haberse realizado la cosecha y almacenado en oscuridad a 23°C . Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Otra de las determinaciones que se llevaron a cabo fue la determinación de F_v/F_m , a través de la fluorescencia emitida por la clorofila. Las determinaciones de fluorescencia de la clorofila fueron inicialmente desarrolladas como una herramienta para el estudio de la fotosíntesis. Los cambios en las membranas de los cloroplastos y sus constituyentes se ven reflejados en las características diferenciales de emisión de fluorescencia. Dentro de las aplicaciones de la técnica se lo ha utilizado como indicador de estrés atmosférico (DeEll *et al.*, 2000), de efectos dañinos por bajas (Wang, 1993) y altas temperaturas (Smillie, 1992) y como parámetro de madurez (Smillie *et al.*, 1987) o senescencia (Gross & Ohad, 1983).

Al determinar F_v/F_m en hojas de espinaca, no se vieron diferencias significativas respecto de los valores hallados al momento de la cosecha, tanto en hojas maduras ($0,831 \pm 0,014$) como en hojas jóvenes de espinaca ($0,836 \pm 0,022$), como se puede observar en la Figura 1.2, lo que estaría indicando que en etapas muy tempranas de la senescencia este valor no se modifica sustancialmente.

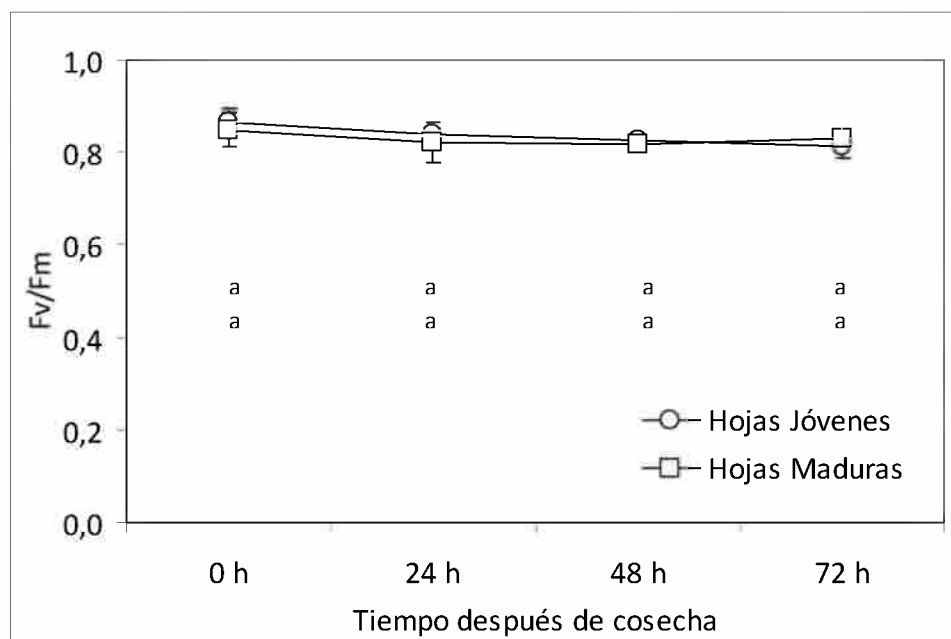


Figura 1.2 Rendimiento cuántico potencial del fotosistema II en hojas jóvenes y maduras de espinaca a las 0, 24, 48 y 72 h de haberse realizado la cosecha y almacenado en oscuridad a 23°C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Otro de los parámetros que determinan la integridad de las membranas es la fuga de solutos. Las membranas biológicas son sistemas dinámicos que actúan en numerosas reacciones bioquímicas y biofísicas, siendo a su vez el blanco de diversos factores que producen estrés. Estos cambios se encuentran asociados a la permeabilidad de las membranas, afectando la compartimentalización celular (Campos *et al.*, 2003). Como se puede observar en la Figura 1.3, tanto las hojas jóvenes como maduras disminuyeron la cantidad de solutos perdidos transcurridas las 24 h de iniciado el experimento. Las hojas maduras mantuvieron el valor de conductividad en un promedio de $11,6 \pm 0,9 \mu\text{S cm s}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$, mientras que las hojas jóvenes mostraron un aumento significativo a las 72 h ($17,0 \pm 2,8 \mu\text{S cm s}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$), comparado con los valores hallados a las 24 ($11,6 \pm 0,4 \mu\text{S cm s}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$) y 48 h ($13,0 \pm 1,6 \mu\text{S cm s}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$) en la misma clase de hojas. Patrones similares han sido encontrados por Rolny *et al.* (2011) en hojas no senescentes de cebada, donde el aumento de la pérdida de solutos se observa recién a los 3 d de que las hojas fueron separadas de la planta. Estos mismos autores llegaron a la conclusión que los electrolitos que se pierden en etapas tempranas de la senescencia corresponden en mayor medida al ion NH_4^+ . Por lo tanto antes de que se produzca un daño significativo a las membranas celulares, este ion estaría difundiendo tempranamente a través de las membranas.

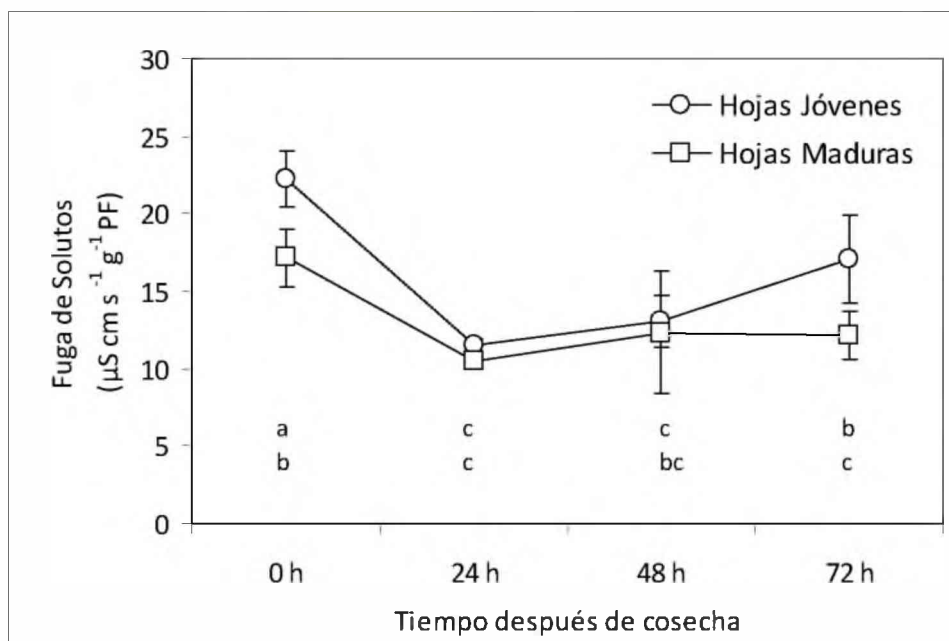


Figura 1.3 Fuga de solutos en hojas jóvenes y maduras de espinaca a las 0, 24, 48 y 72 h de haberse realizado la cosecha y almacenado en oscuridad a 23 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

4.1.2 Estrés oxidativo en hojas jóvenes y maduras de espinaca en postcosecha

Las plantas poseen complejos de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que juegan una función muy importante en la regulación del estado estacionario de las EAO, como son el ion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), y el oxígeno singulete (1O_2) (Foyer *et al.*, 1994; Hodges *et al.*, 1996, 1997 *a,b*). Dentro de los antioxidantes enzimáticos, se incluyen la ascorbato peroxidasa (APX) (en diferentes fracciones: asociada a membrana tilacoidal -APXm-, estromática -APXe- y citosólica -APXc-), la catalasa (CAT), y la superóxido dismutasa (SOD). La SOD dismuta a $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , el cual es reducido a H_2O por medio de CAT en los peroxisomas o por medio de APX en el citosol (APXc) o en los cloroplastos (APXm y APXe), por medio de la oxidación de AA (Trümper *et al.*, 1994).

Es sabido que durante la senescencia de los tejidos vegetales se ven cambios en la permeabilidad de las membranas, y dichos cambios se ven asociados a la composición lipídica de las membranas (Matsuo *et al.*, 1984). Los ácidos grasos libres

se acumulan en las membranas después de que los tejidos son expuestos a factores de stress, como también por procesos propios de la senescencia. Es en las membranas donde se da una degradación selectiva de los ácidos grasos. Por ejemplo, los fosfolípidos son degradados por fosfolipasas (Barclay & McKersie, 1994) o por medio de hidrolasas. Los ácidos grasos resultantes pueden ser oxidados por lipoxigenasas y formar hidroxiperóxidos (Whitaker, 1990). Todos estos productos de oxidación pueden actuar como oxidantes sobre vitaminas y a su vez estimular la degradación de clorofila (Yamauchi & Watada, 1991). El MDA es el mayor producto de degradación de los lípidos, sirviendo como un marcador de peroxidación de membranas (Botsoglou *et al.*, 1994; Hodges *et al.*, 1999).

Para la determinación de los parámetros de estrés oxidativo en hojas de espinaca se tuvieron en cuenta como indicadores a la actividad de las enzimas CAT, APXc, APXm, como así también el contenido de MDA como indicador de daño a membranas.

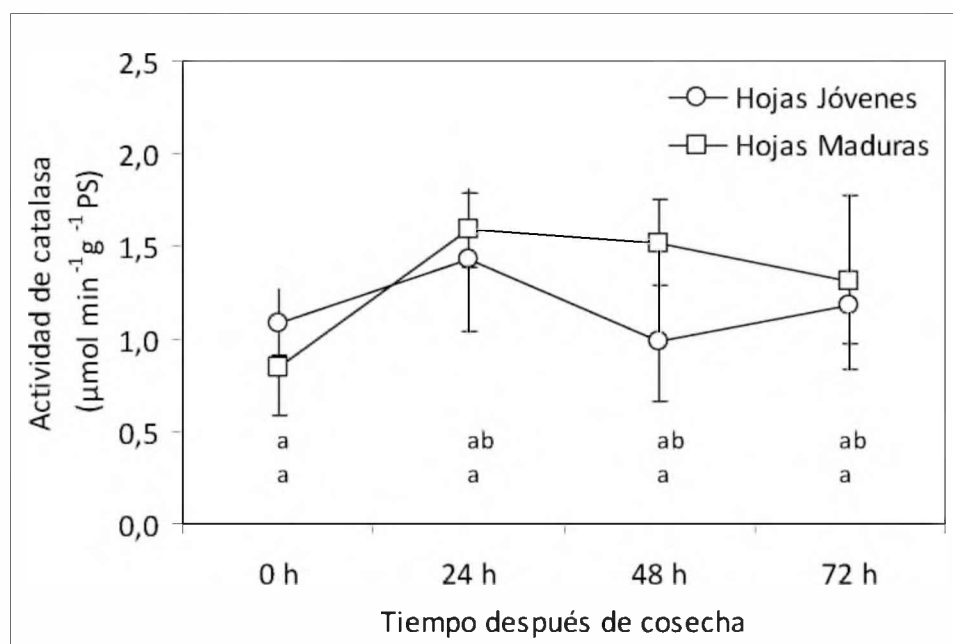


Figura 1.4 Actividad de catalasa en hojas jóvenes y maduras de espinaca a las 0, 24, 48 y 72 h de haberse realizado la cosecha y almacenado en oscuridad a 23°C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Como se observa en la Figura 1.4, la actividad de CAT aumentó en hojas maduras a las 24 y 48 h, luego disminuyendo a valores similares a los hallados en el momento de cosecha. Por otro lado, las hojas jóvenes, a pesar de la variabilidad de los datos

obtenidos, no vieron modificada la actividad durante todo el ensayo. Este pico de mayor actividad de CAT en hojas maduras se adelantó respecto de los valores hallados por Hodges & Forney (2000), quienes encontraron que el pico se producía a los 7 d de cosecha y luego bajaba constantemente hasta el día 35.

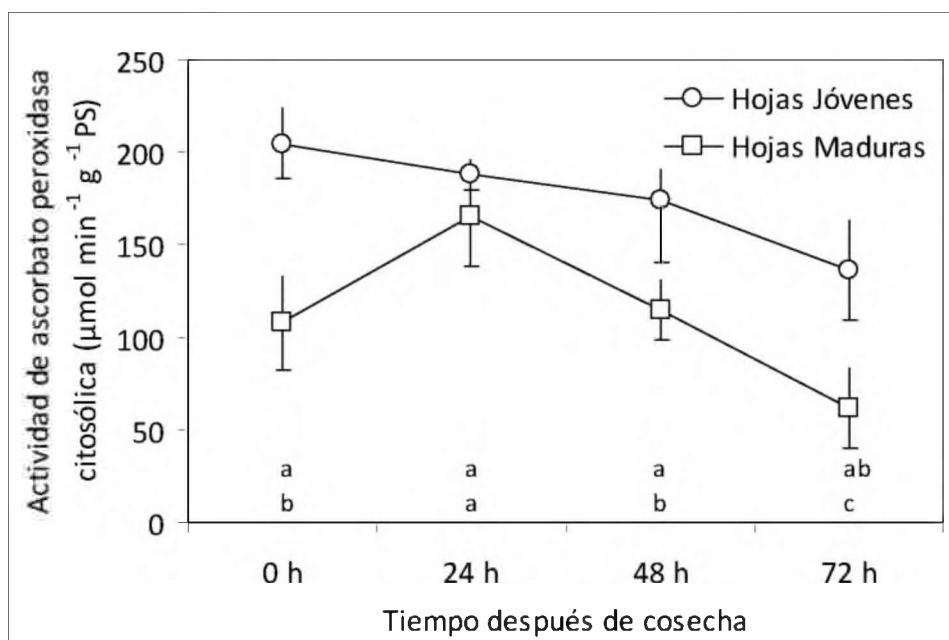


Figura 1.5 Actividad de ascorbato peroxidasa fracción citosólica (APXc) en hojas jóvenes y maduras de espinaca a las 0, 24, 48 y 72 h de haberse realizado la cosecha y almacenado en oscuridad a 23°C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

En la Figura 1.5 la actividad de APXc en hojas jóvenes de espinaca tiene una tendencia a disminuir constantemente a medida que avanza el almacenamiento en oscuridad, mientras que en las hojas maduras, hay un aumento momentáneo a las 24 h, para luego seguir la misma tendencia. De la misma manera que con CAT, la APXc muestra la misma tendencia en las hojas maduras. A su vez, en el trabajo de Hodges & Forney (2000) se muestra que este aumento se da a los 7 d de iniciado los experimentos, lo que también estaría indicando un adelanto de la variedad utilizada en esta tesis respecto de otras o bien el efecto del almacenamiento con refrigeración. La APXm no tuvo cambios durante todo el experimento (Figura 1.6).

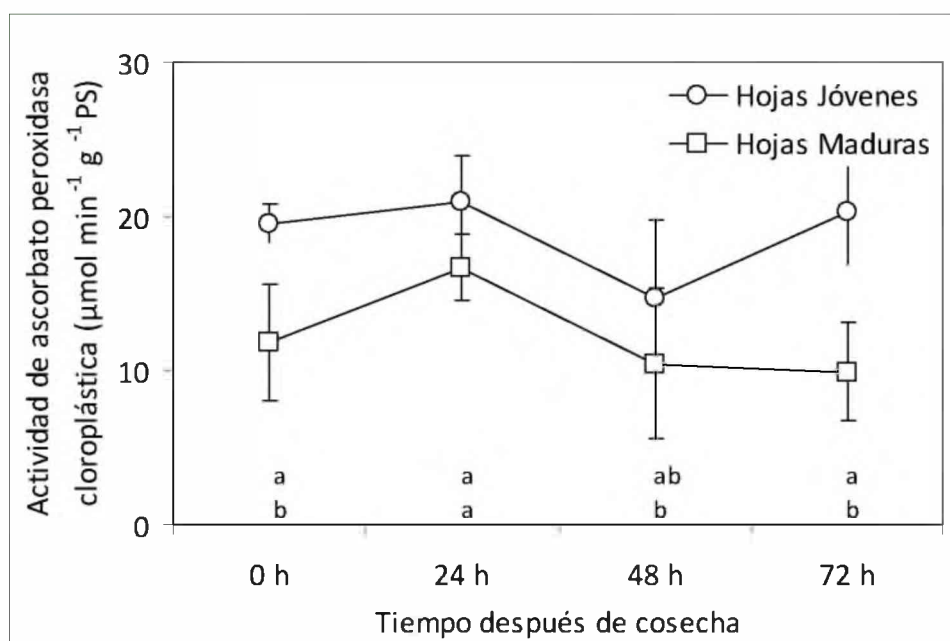


Figura 1.6 Actividad de ascorbato peroxidasa fracción cloroplástica en hojas jóvenes y maduras de espinaca a las 0, 24, 48 y 72 h de haberse realizado la cosecha y almacenado en oscuridad a 23°C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

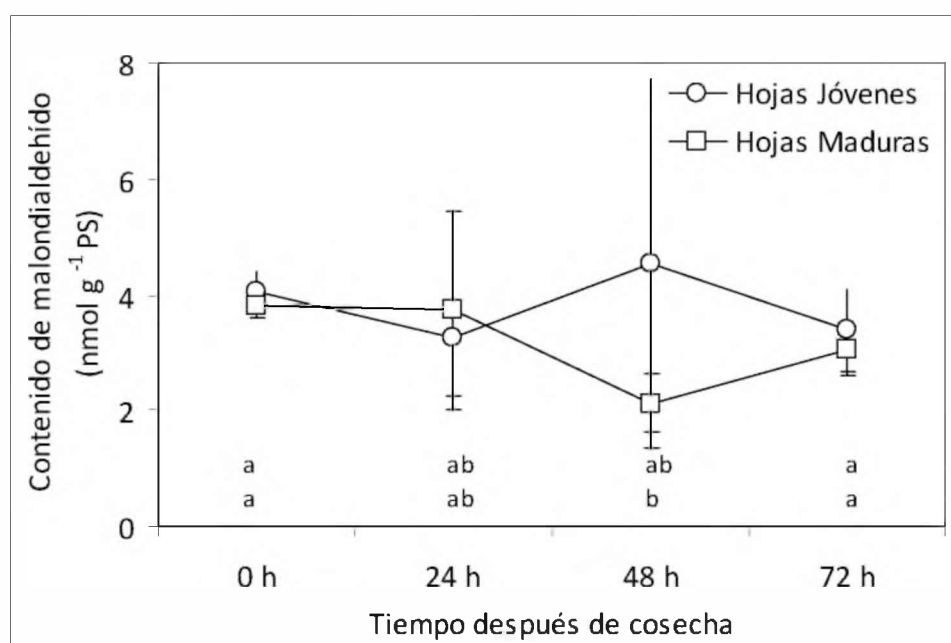


Figura 1.7 Contenido de MDA en hojas jóvenes y maduras de espinaca a las 0, 24, 48 y 72 h de haberse realizado la cosecha y almacenado en oscuridad a 23°C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

En la Figura 1.7 el contenido de MDA no se vio modificado respecto del valor hallado al momento de cosecha, lo que estaría indicando que las hojas tanto jóvenes como maduras no han comenzado con el síndrome de senescencia antes descrito a los

3 d de cosechadas. Estos resultados concuerdan con los hallados por Lopez-Ayerra *et al.* (1998) y por Hodges & Forney (2000) en hojas de espinaca mantenidas en oscuridad por el término de 3 d.

La pérdida de la integridad de las membranas, que es uno de los efectos comunes de la senescencia (Thompson, 1988), con la subsiguiente pérdida de integridad de las organelas, producen un aumento en la producción de EAO en las células vegetales. En las hojas estudiadas en este punto inicial de la senescencia, se han detectado cambios en la producción de H_2O_2 *in vivo*, tanto en hojas jóvenes como maduras, viéndose un aumento hasta las 48 h. Este punto se discutirá en el Capítulo II.

4.2 Capítulo II

4.2 Capítulo II

4.2.1 Contenido de AA y su estado redox en hojas jóvenes y maduras durante la senescencia temprana ocasionada por oscuridad y etileno

La senescencia es la última etapa en el desarrollo foliar, en el cual se encuentra involucrada la degradación de los componentes celulares para ser removilizados hacia los órganos en activo crecimiento (Lim *et al.*, 2007). El contenido de clorofila es uno de los parámetros más ampliamente utilizados para la caracterización del síndrome de senescencia (Hörtensteiner *et al.*, 2004), sumado a la degradación de proteínas, al desmantelamiento del aparato fotosintético y las modificaciones en el contenido y estado redox de los antioxidantes. Cuando las hojas son cortadas y almacenadas en la oscuridad, muchos de los parámetros de la senescencia se ponen en evidencia (Noodén *et al.*, 1997). La senescencia se encuentra bajo un fuerte control hormonal (Schippers *et al.*, 2007) y la separación de las hojas de la planta provoca un desbalance hormonal. Por un lado, las citocininas que son producidas en la raíz, no son abastecidas por el sistema conductor y por el otro, las hojas cortadas aumentan la producción de etileno.

También es sabido que los daños ocasionados al manipular las hojas, producen una aceleración de la senescencia, a través del aumento en la producción de etileno acompañado también de un incremento de la respiración. Este proceso se da en dos etapas en hojas de espinaca: una a los 2 d, para luego descender y aumentar nuevamente a los 8 d (Philosoph-Hadas *et al.*, 1991). Sin embargo los cambios en el contenido y estado redox de antioxidantes no han sido tratados con suficiente profundidad y no se ha dilucidado totalmente la relación con el metabolismo del etileno.

Uno de los cambios más importantes observados durante la senescencia vegetal es la disminución de los niveles de antioxidantes y el incremento de las EAO, produciéndose cambios en el sistema redox de la célula, aumentando el porcentaje de compuestos que se encuentran en su forma oxidada (Vanacker *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2006). Las EAO se pueden producir durante el metabolismo

normal de las plantas (Foyer *et al.*, 1994), como así también por efectos desfavorables del ambiente como pueden ser la sequía, la exposición a ozono o debido al ataque de patógenos. Las EAO, además de su efecto dañino sobre las biomoléculas de la célula, pueden actuar como señales moleculares (Davletova *et al.*, 2005). Las EAO deben ser rápidamente controladas para evitar daños estructurales o funcionales (Smirnoff & Pallanca, 1996). El AA es el antioxidante más abundante en medios hidrosolubles y es considerado el componente central en el metabolismo redox de la célula vegetal (Noctor & Foyer, 1998). El AA se encuentra en altas concentraciones en los cloroplastos, protegiendo a los mismos de la fotoinhibición del fotosistema II y forma parte fundamental de un ciclo de óxido-reducción (Halliwell & Foyer, 1976).

El etileno es una de las hormonas que se encuentran asociadas a la senescencia, acompañando al descenso en el contenido de antioxidantes, especialmente AA, en pétalos de claveles (*Dianthus caryophyllus* L.) (Bartoli *et al.*, 1996). Hodges & Forney (2000) mostraron que aplicaciones exógenas de etileno a hojas de espinaca producen una disminución en el contenido de AA. Sin embargo, no se ha profundizado hasta el momento en la caracterización de la vía de síntesis y de recuperación de las formas oxidadas del AA, ni en el efecto que puede tener la edad de la hoja en la regulación de dicha síntesis. Tampoco se han tenido en cuenta otros antioxidantes como los tocoferoles, que actúan en medios lipídicos como las membranas tilacoidales (Foyer & Noctor, 2003). A su vez las variaciones en la concentración del AA se encuentran asociadas a los estadios de desarrollo de diferentes órganos, encontrándose en altas concentraciones en órganos jóvenes y declinando con la edad (Conklin *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003).

4.2.2 Efecto del tratamiento de etefón sobre los parámetros de senescencia en hojas jóvenes y maduras de espinaca

Para determinar la concentración mínima de etefón que es necesaria para producir síntomas tempranos de senescencia en hojas de espinaca, se evaluó la evolución del contenido de clorofila, el rendimiento potencial del fotosistema II y la fuga de solutos. Se probaron concentraciones de 50, 100 y 200 ppm de etefón aplicadas

por 20 min en hojas jóvenes y maduras. Solamente al aplicar 200 ppm de etefón se detectaron efectos sobre los parámetros de senescencia antes mencionados (datos no mostrados).

Estudios previos llevados a cabo por Yamauchi & Watada (1991) demostraron que las hojas de espinaca comienzan a declinar en su contenido de clorofila, especialmente en clorofila A, recién a las 72 h de ser expuestas a 25 °C de temperatura ante la presencia de etileno. Estos mismos autores pudieron observar que hojas sin tratamiento con etileno vieron modificado su contenido de clorofila, pero dicho proceso de degradación se da a una menor tasa respecto de los que sí se aplicó dicha hormona. Estos resultados concuerdan parcialmente con los hallados en la presente tesis (Figura 2.1), en donde no se han visto cambios hasta las 72 h, donde las hojas maduras tratadas con etefón vieron disminuido su contenido de clorofila significativamente respecto del control no tratado.

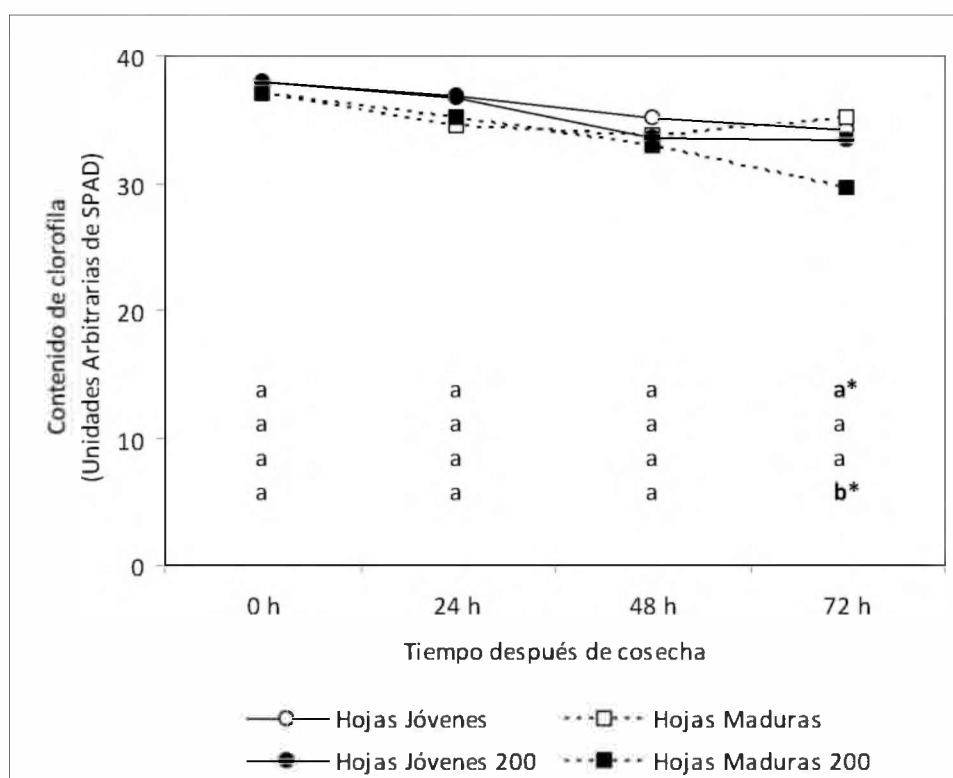


Figura 2.1 Evolución del contenido de clorofila en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Por otro lado, el contenido de clorofila no se ha visto asociado a la edad de la hoja. Tanto las hojas jóvenes como maduras no presentan diferencias significativas; sin

embargo las hojas maduras tratadas con etefón son las únicas que han visto modificados su contenido hacia el final de los experimentos. Resultados similares han sido encontrados en otra hortaliza de hoja (*Eruca sativa* Mill.) (Koukounaras *et al.*, 2007), en donde el contenido de clorofila no se vio modificado en hojas jóvenes sino hasta los 10 d de almacenamiento en oscuridad. Sin embargo, en este mismo trabajo sí se vieron efectos sobre las hojas maduras. Jing *et al.* (2005) utilizando hojas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn llegó a la conclusión de que el efecto del etileno es marcado en las hojas a partir de que estas tienen una edad determinada, y que las hojas jóvenes se comportan como menos sensibles al efecto de esta hormona. Por otro lado se vio un aumento en la transcripción de los SAGs (del inglés *Senescence Associated Genes*) ante las aplicaciones crecientes de etileno, concomitantemente con un fuerte decrecimiento en el contenido de clorofila (Jing *et al.*, 2005).

Otros resultados obtenidos por Jian *et al.* (2002), demuestran que aplicaciones exógenas de etileno sobre hojas de coriandro (*Coriandrum sativum* L.) provocaron un descenso más marcado en el contenido de clorofila en hojas recién a las 72 h, con diferencias significativas respecto del control no tratado con la hormona.

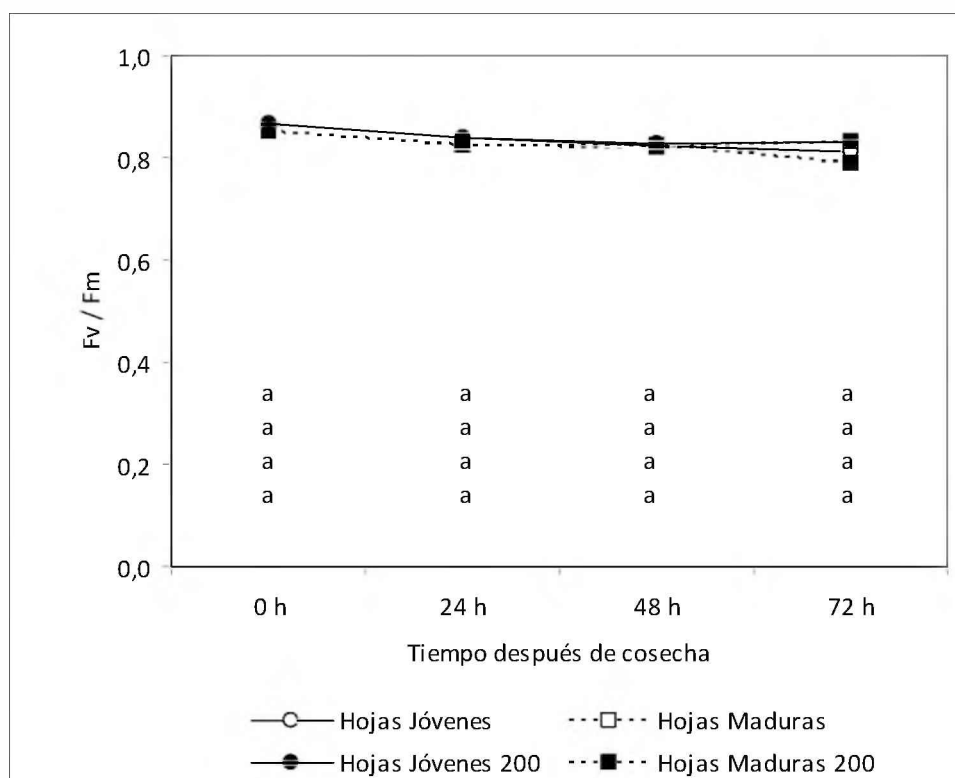


Figura 2.2 Evolución del rendimiento potencial del fotosistema II (F_v/F_m) en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Por otro lado, el rendimiento cuántico potencial del fotosistema II, que es una medida de su integridad (Toivonen, 1992), no se vio modificado en ninguno de los casos (Figura 2.2), siendo el efecto de la edad de la hoja y el tratamiento con etileno independientes respecto de este parámetro de senescencia. Esto estaría indicando a su vez que nos encontramos en un estadio muy temprano en la senescencia de las hojas de espinaca a partir del momento en que son separadas de la planta.

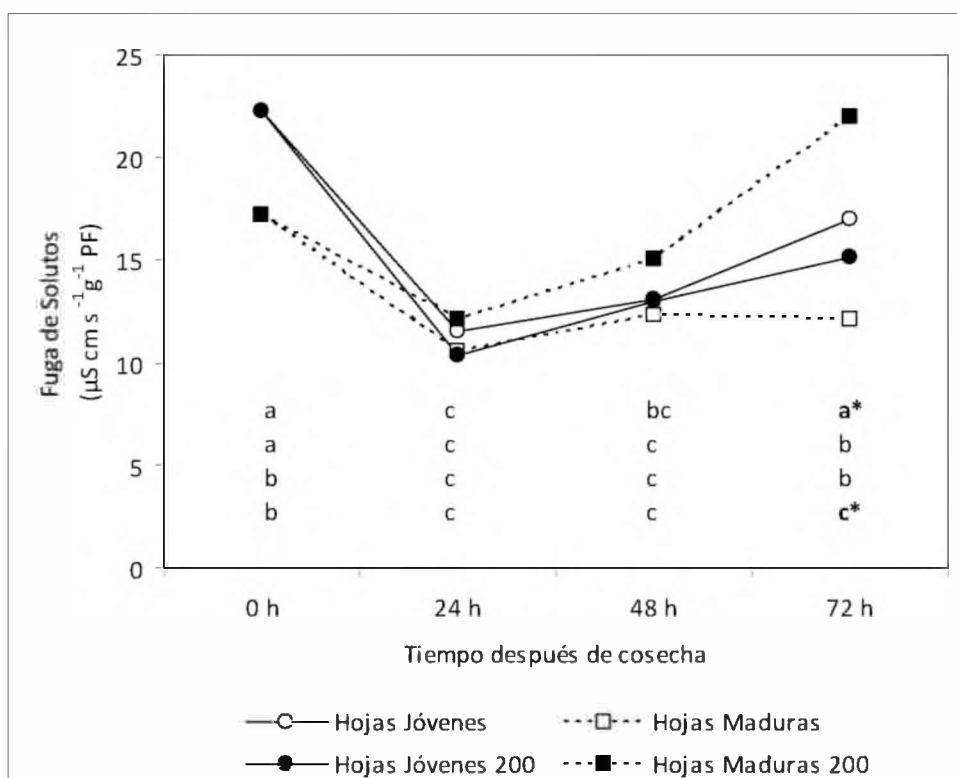


Figura 2.3 Evolución de la fuga de solutos en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Otro de los parámetros de senescencia que se determinó fue la fuga de solutos. La fuga de solutos es uno de los parámetros que mide la integridad de las membranas, utilizado para estudiar los efectos de diversos tratamientos como sequía, senescencia (Whitlow *et al.*, 1992), daños por frío (Murray *et al.*, 1989) y otros. Como se puede observar en la Figura 2.3, no se han observado cambios significativos en la fuga de solutos de hojas jóvenes y maduras no tratadas. Solamente se ha visto un aumento significativo en la conductividad a las 72 h en hojas maduras tratadas con 200 ppm de etefón. Bailey *et al.* (1990) trabajando con hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) sugiere que la síntesis de etileno y la fuga de solutos son procesos independientes

durante la senescencia; sin embargo los resultados presentados en esta tesis demuestran que la fuga de solutos y el contenido de clorofila se vieron modificados por la aplicación de etefón.

4.2.3 Estrés oxidativo en hojas jóvenes y maduras de espinaca en postcosecha tratadas con etefón

Otro de los determinantes de la integridad de membranas es el contenido de MDA. El MDA es uno de los productos de la peroxidación lipídica, sirviendo como indicador de la producción de radicales libres (Pardha *et al.*, 1995). En la Figura 2.4 se puede observar que los tratamientos con 200 ppm de etefón no tuvieron efecto sobre el contenido de MDA, tanto en hojas maduras como jóvenes al cabo de 3 d de almacenamiento en la oscuridad. De acuerdo a resultados obtenidos por Hodges & Forney (2000), las hojas maduras de espinaca tratadas con etileno vieron aumentado el contenido de MDA sino hasta 14 d después del momento de cosecha en condiciones refrigeradas, no mostrándose hasta ese momento diferencias significativas con el control no tratado.

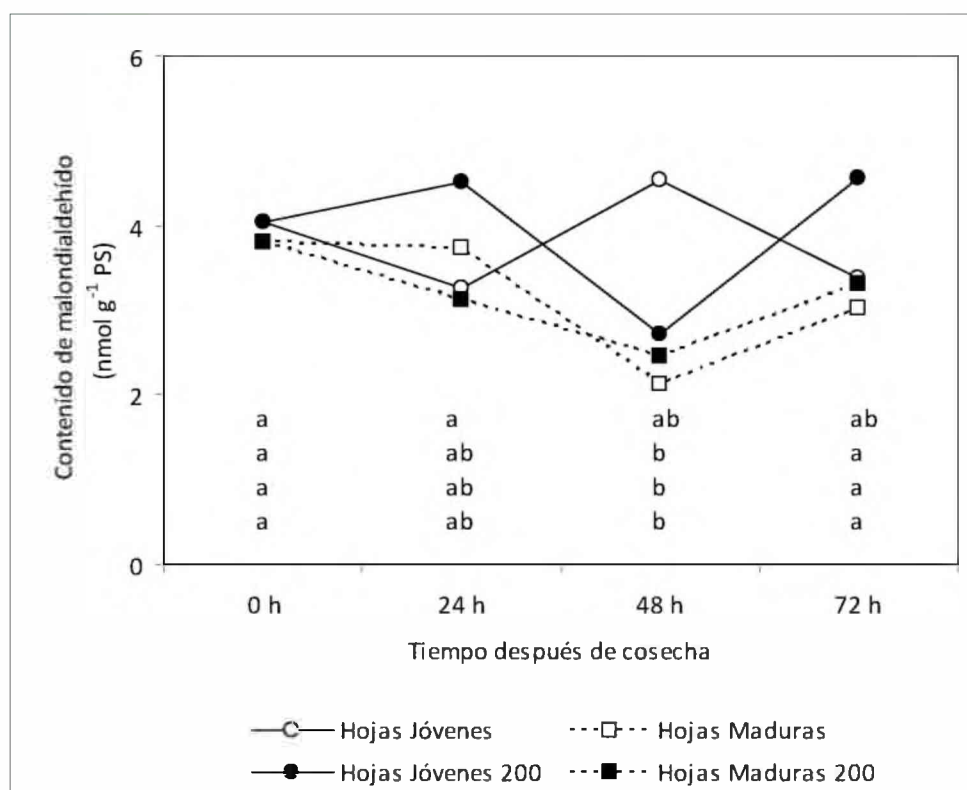


Figura 2.4 Contenido de MDA en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Dentro de los parámetros que dan una idea de la producción de EAO, la liberación de H_2O_2 *in vivo* es uno de ellos. En la Figura 2.5, se puede observar un aumento de todos los tratamientos hasta las 48 h, disminuyendo hacia el final, a las 72 h. No se han visto diferencias significativas comparando hojas jóvenes y maduras respecto de los tratamientos con 200 ppm de etefón. Por lo tanto el etileno aplicado exógenamente no tiene un efecto directo sobre la liberación de H_2O_2 *in vivo*, tanto en hojas maduras como jóvenes, como así tampoco en el contenido de MDA.

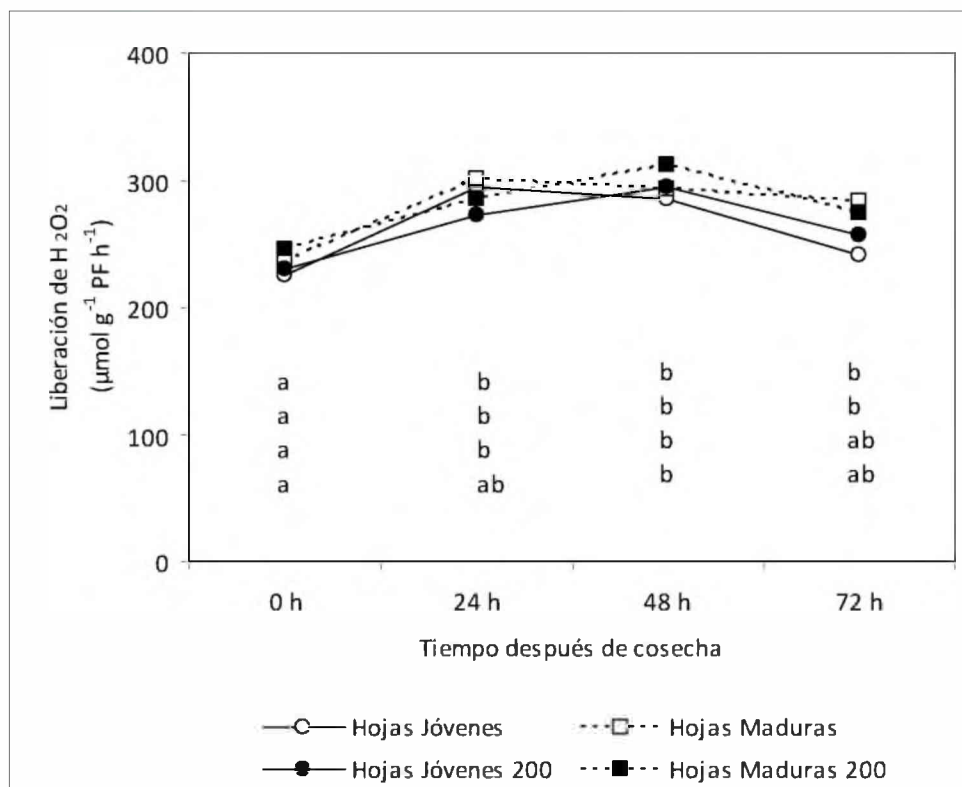


Figura 2.5 Evolución de la Liberación de H_2O_2 *in vivo* en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Debido a la actividad fotosintética de las plantas, los cloroplastos son la mayor fuente de EAO (Baier & Dietz, 2005; Asada, 2006; Rhoads *et al.*, 2006), por lo que estas deben estar bajo un estricto control para mantener el balance redox de la célula (Murgia *et al.*, 2004; Kariola *et al.*, 2005; Perez-Ruiz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). En los períodos de oscuridad o en órganos no fotosintéticos, las mitocondrias son la fuente principal de EAO (Puntarulo *et al.*, 1988). Evidencia reciente sugiere que las mitocondrias, además de los cloroplastos, están relacionadas al balance redox de la célula (Dutilleul *et al.*, 2003; Noctor *et al.*, 2007).

El proceso de senescencia foliar cumple la función de removilizar los nutrientes, produciéndose la desintegración de los cloroplastos. Durante la senescencia, las EAO son producidas activamente causando cambios en los componentes reguladores de la célula (Vanacker *et al.* 2006; Zimmermann *et al.* 2006).

Dentro del grupo de las enzimas que destoxifican las células vegetales de las EAO, las más importantes por su actividad son la CAT, la SOD y la APX (Apel & Hirt, 2004; Smirnoff & Wheeler, 2000). De acuerdo a Watkins & Rao (2003), tanto CAT como SOD bajan su actividad durante la senescencia, con un aumento concomitante del peróxido

de hidrógeno. Muy pocos han sido los trabajos que relacionan la actividad de las EAO con diferentes tasas de senescencia (Hodges *et al.*, 2001). Jiménez *et al.* (2003) relaciona la actividad de enzimas antioxidantes con la edad de los frutos. En este caso compara frutos verdes (jóvenes) con rojos (maduros) de pimiento (*Capsicum annumm* L.). Ha llegado a encontrar que la actividad de SOD, CAT y APX disminuyen con la edad. Esto se puede ver con CAT en la Figura 2.6, que al momento de la cosecha presenta una mayor actividad las hojas jóvenes respecto de las hojas maduras. De la misma manera se puede observar en APXc (Figura 26) y en APXm (Figura 27).

Respecto de CAT, se puede observar en la Figura 2.6 que la actividad es mayor en las hojas jóvenes tratadas con etefón, respecto de sus controles a las 48 y 72 h de almacenamiento en oscuridad.

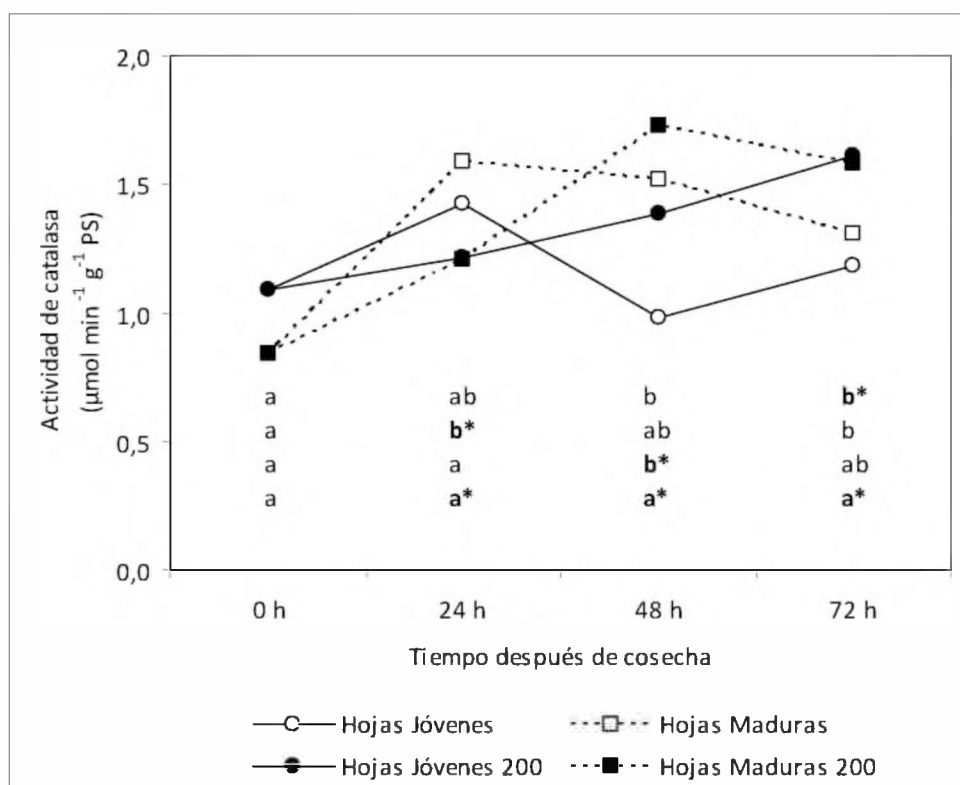


Figura 2.6 Actividad de catalasa en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Por otro lado, no se han observado diferencias significativas en la actividad de APXc (Figura 2.7) y en APXm (Figura 2.8) cuando se comparan hojas tratadas versus los controles. Sin embargo en APXc (Figura 2.7) se ve una tendencia a disminuir la actividad a medida que avanzan los procesos de senescencia. Estos datos coinciden con los hallados por Hodges & Forney (2000) en hojas de espinaca sometidas a oscuridad. Por

lo tanto el estrés oxidativo no se ve afectado en las primeras etapas de senescencia foliar de espinaca, tanto en hojas jóvenes como maduras.

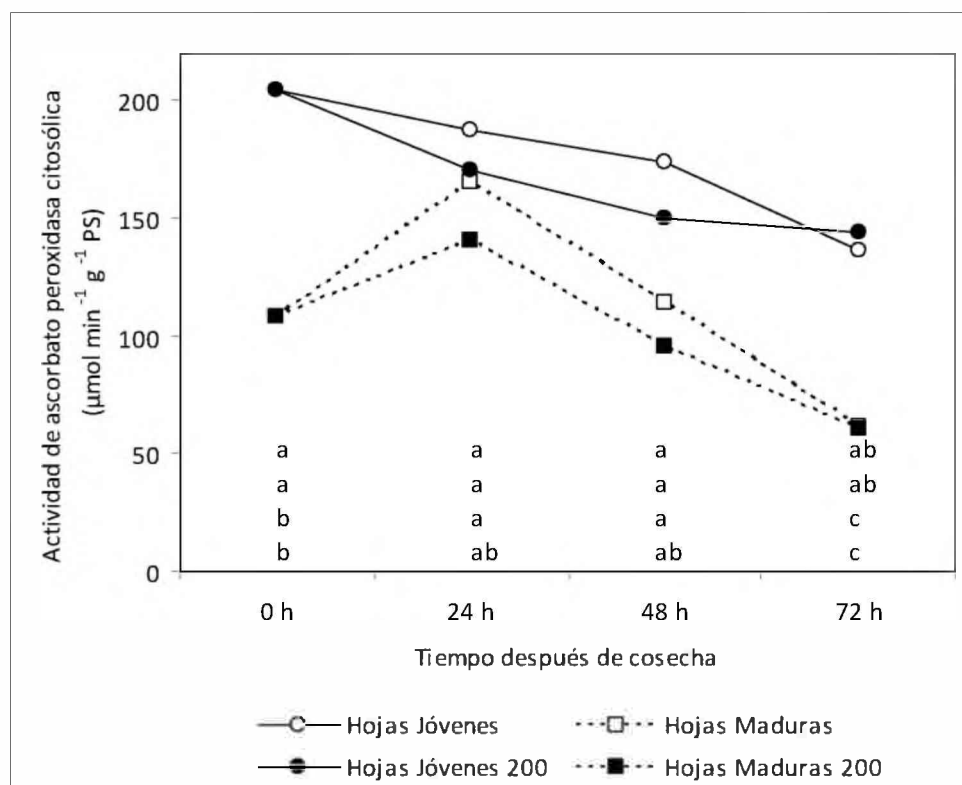


Figura 2.7 Actividad de ascorbato peroxidasa citosólica en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

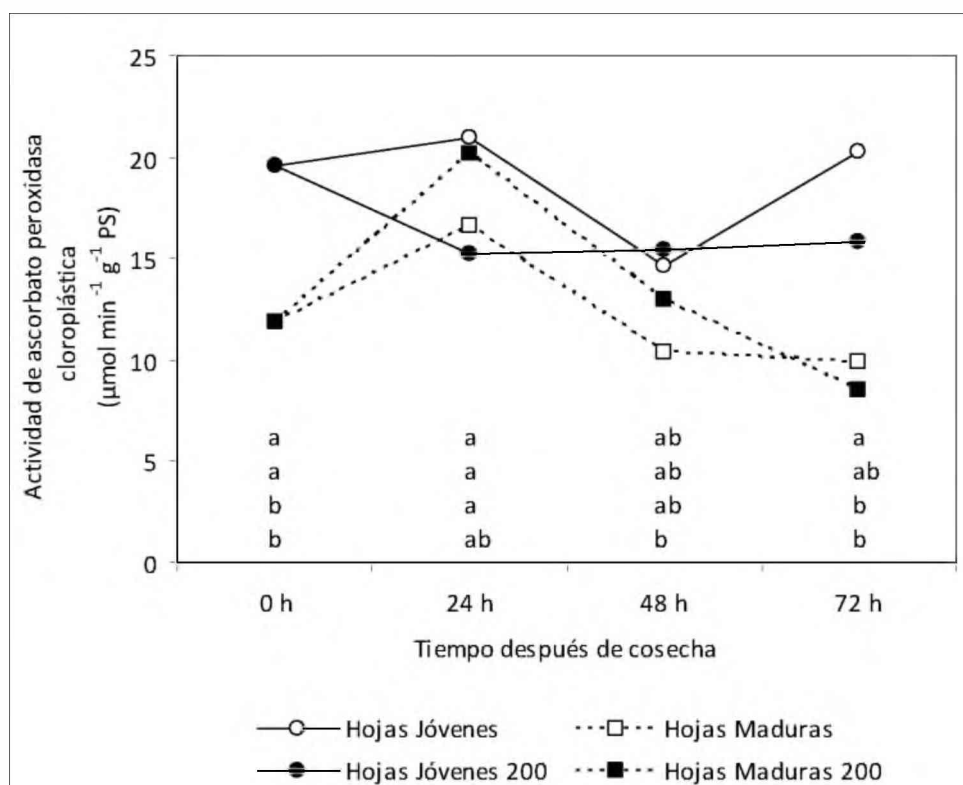


Figura 2.8 Actividad de ascorbato peroxidasa cloroplástica en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. La letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

4.2.4 Efecto del etefón sobre el contenido y estado redox de los antioxidantes en hojas jóvenes y maduras de espinaca

Con respecto al contenido de AA, se ha podido detectar un descenso constante durante el almacenamiento en oscuridad, tanto en hojas jóvenes como maduras. Las hojas jóvenes sin tratar con etefón disminuyeron el contenido de AA en un 38 %, mientras que las hojas maduras un 60 % respecto del valor inicial. La aplicación de 200 ppm de etefón no produjo diferencias significativas en hojas jóvenes durante todo el experimento comparado con el tratamiento control. Sin embargo, las hojas maduras tratadas con etefón mostraron descensos significativos a las 48 y 72 h respecto del control sin tratar (Figura 2.9). Respecto del estado redox, se puede ver que el porcentaje de AA que se encuentra en su forma oxidada se ve afectado por la acción del etefón. En el caso de las hojas jóvenes se produce un aumento temprano a las 24 h, bajando nuevamente a las 48 h al valor inicial y manteniéndose alrededor del 10 %. Por otro lado, las hojas maduras presentan un rápido aumento a las 48 h, aumentando un

78 % desde las 24 a las 48 h (Figura 2.10). Estos resultados concuerdan con Gil *et al.* (1999), en donde el contenido de AA y de flavonoides disminuye con el almacenamiento de hojas de espinaca en atmósfera controlada en oscuridad, aumentando la proporción de DHA y disminuyendo, concomitantemente, la capacidad antioxidante.

Estos resultados aquí presentados muestran que el etileno promueve el descenso en el contenido de AA a las 48 h, sin que se evidencien en ese momento cambios de los parámetros de senescencia en hojas maduras de espinaca (Gergoff *et al.*, 2010a). Estos datos concuerdan con los observados por Jiménez *et al.* (1998), donde se vio que la inducción de la senescencia debida a la oscuridad hizo disminuir el contenido de AA en mitocondrias de hojas de arvejas (*Pisum sativum* L.).

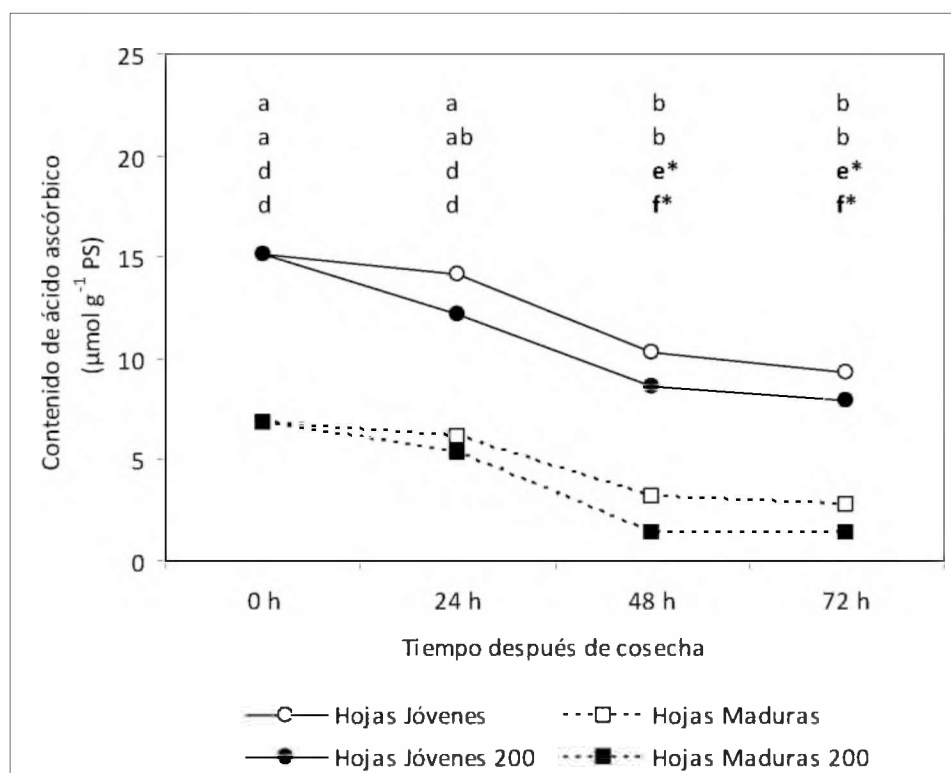


Figura 2.9 Contenido de AA en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

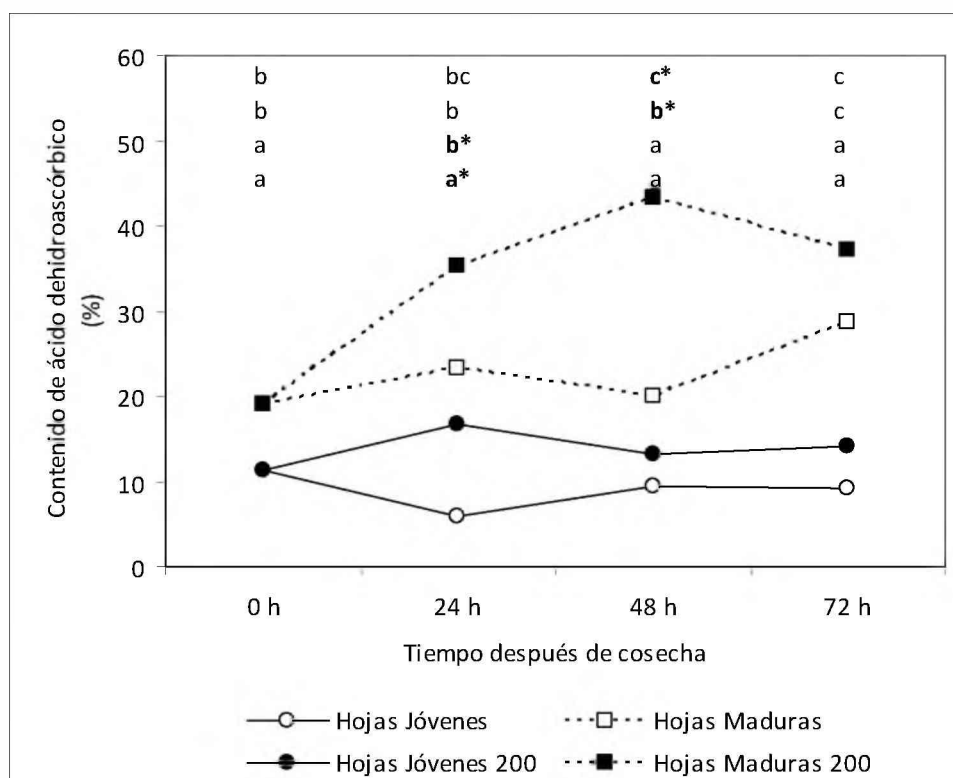


Figura 2.10 Contenido de DHA (%) en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Trabajos previos han demostrado que la oscuridad lleva a la disminución del contenido de AA, bajando hasta casi un 80 % respecto del valor inicial en las paredes celulares de hojas de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) en el término de 48 h, aumentando concomitantemente los daños por la exposición posterior de ozono (Moldau, *et al.*, 1998). También se ha demostrado que aplicaciones exógenas de AA han retrasado exitosamente los procesos de senescencia en hojas (Borracino *et al.*, 1994; Garg & Kapoor, 1972).

Otro de los fenómenos que se observa es que al separar la hoja de la planta madre, se produce un descenso del contenido de AA. Se ha postulado que la fuente de fotoasimilados para la biosíntesis de AA se encuentra limitada por vía de los sustratos, más que por la capacidad de síntesis propia de la hoja (Franceschi & Tarlyn, 2002). Estos resultados concuerdan con la disminución en el contenido de AA a lo largo de todo el experimento en hojas de espinaca (Figura 2.9).

Otro de los posibles motivos por los cuales la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa citosólica y ascorbato peroxidasa cloroplástica disminuyen su actividad constantemente, puede ser debido a la disminución de la concentración de AA, como

fuentes dadoras de electrones para reducir al H_2O_2 presente en las células. Esto ha sido también mencionado para hojas de espinacas por Hodges & Forney (2000) en condiciones similares de almacenamiento.

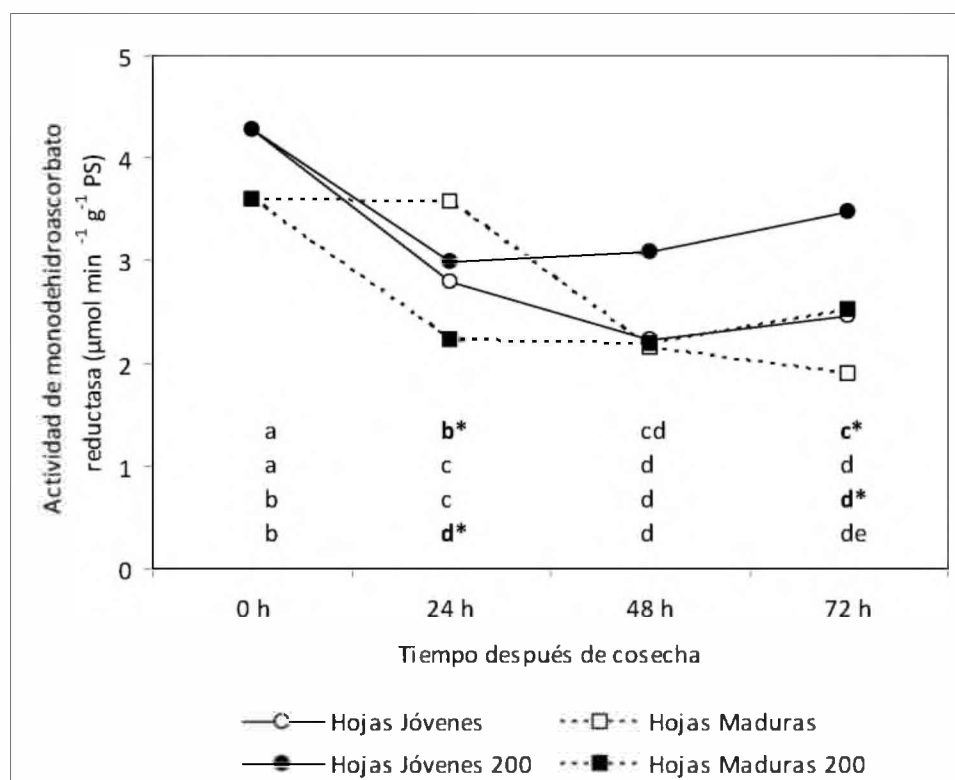


Figura 2.11 Actividad de MDHAR en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

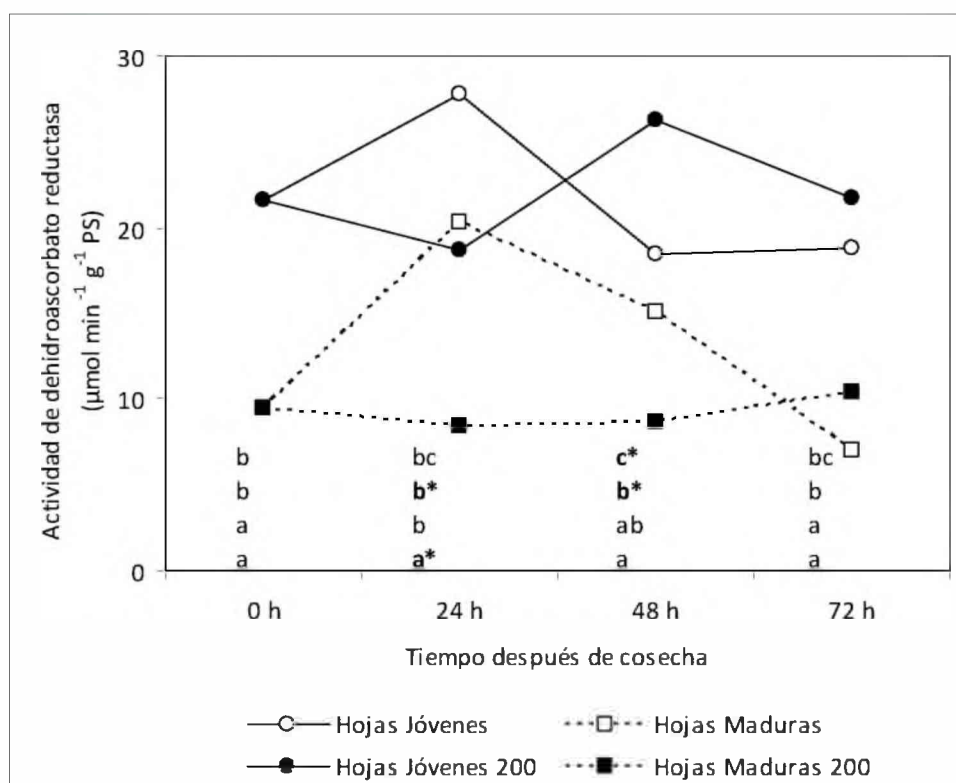


Figura 2.12 Actividad de DHAR en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Respecto de las enzimas que recuperan las formas oxidadas del AA, tanto la MDHAR como la DHAR presentan mayores actividades en hojas jóvenes tratadas con 200 ppm a las 24 y 48 h posteriores al tratamiento, respectivamente (Figuras 2.11 y 2.12). Por otro lado, en hojas maduras el descenso de las actividades de MDHAR (Figura 2.11) y DHAR (Figura 2.12) se observa a las 24 h, mientras que el pico de DHA (%) se da a las 48 h (Figura 2.10). Se ha visto que el aumento de la actividad de DHAR produce una importante disminución del pool de AA que se encuentra en su forma oxidada (Chen *et al.*, 2003). En este caso, esta diferencia se puede apreciar claramente cuando se comparan hojas jóvenes con una alta actividad de DHAR a las 48 h (Figura 2.12) y de MDHAR a las 72 h (Figura 2.11) y una baja proporción de DHA respecto al AA total a las 48 y 72 h (Figura 2.10), mientras que las hojas maduras se comportan de manera inversa, es decir, baja actividad de DHAR a las 24 h (Figura 2.12) y alta proporción de DHA a las 48 h (Figura 2.10).

El último paso de la síntesis de AA se encuentra catalizado por una enzima GLDH, que se encuentra localizada en la membrana interna de la mitocondria (Siendones, *et al.*, 1999; Klodmann *et al.*, 2010), estando fuertemente asociada al Complejo Mitocondrial I (Pineau *et al.*, 2008) e interactuando con la respiración (Millar *et al.*,

2003; Bartoli *et al.*, 2000). Hodges & Forney (2003) han encontrado que la actividad de GLDH se incrementa en hojas de espinaca durante el almacenamiento en la oscuridad. En la presente tesis, se puede evidenciar que la actividad de GLDH aumenta durante las primeras 72 h en hojas maduras, mientras que en hojas jóvenes se presenta una disminución de dicha actividad (Figura 2.13). Se ha visto también que el efecto del etefón sobre hojas maduras reduce significativamente la actividad de GLDH a las 48 y 72 h respecto del control, manteniéndose las hojas tratadas en valores similares a los hallados al momento de cosecha. Por otro lado, como se ha mencionado, las hojas jóvenes disminuyen la capacidad de síntesis de AA, evidenciándose una fuerte baja a las 24 h, para luego equipararse al control sin tratamiento. Se puede observar también que las hojas jóvenes tienen al momento de cosecha 3 veces más actividad de GLDH que las hojas maduras, pero que al ser separadas de la planta madre, disminuye a casi la mitad (Figura 2.13). Debido a que capacidad de síntesis de AA depende de la cantidad de GLDH y de la cadena transportadora de electrones (Bartoli *et al.*, 2005), es de esperar que se requiera un estudio más profundo sobre el efecto de la respiración de hojas tratadas con etileno respecto de la disponibilidad de citocromo c oxidado, que podría estar modificando la actividad de la enzima.

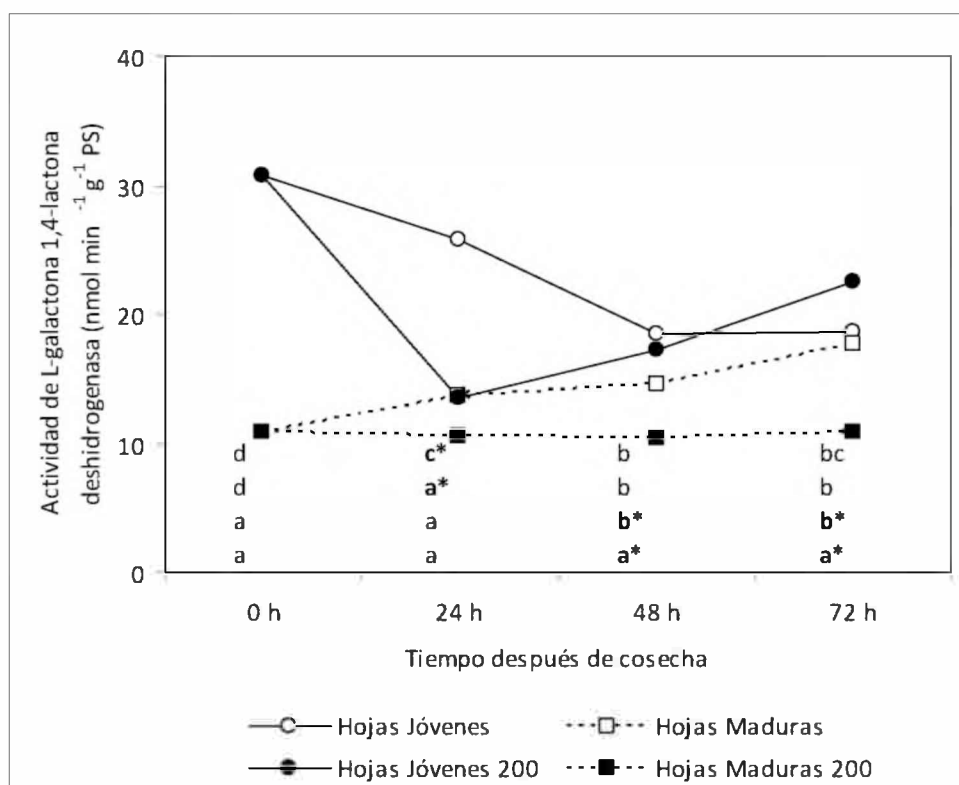


Figura 2.13 Actividad de L-GLDH en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Los datos obtenidos en los experimentos realizados para este trabajo demuestran que el etileno produce una disminución en la síntesis *de novo* de AA, como así también en la actividad de las enzimas que recuperan la forma oxidada de AA en etapas muy tempranas de la senescencia foliar de hojas maduras de espinaca.

Otro de los compuestos asociados al AA es el GSH, cuya función es brindar los electrones para que la DHAR pueda catalizar la reducción del DHA y recuperar nuevamente el AA que es oxidado por el metabolismo celular (Davey *et al.*, 2000). En este caso, no se han detectado cambios en el contenido de GSH (Figura 2.14) o en su estado redox (Figura 2.15) debido al tratamiento con etileno. Solamente se ha visto una disminución significativa a las 48 h en el contenido de GSH en hojas maduras tratadas con 200 ppm de etefón, pero volviendo a valores similares al control sin tratar a las 72 h. Sí se puede afirmar que el contenido de GSH de las hojas jóvenes se ha mantenido sin cambios durante todo el experimento en un valor promedio de $1,7 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS, mientras que las hojas maduras pasaron de 1,5 a $0,7 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS, es decir, bajaron prácticamente a la mitad (Figura 2.14). Estos datos coinciden con las tendencias encontradas en el contenido de AA antes mencionado, en donde la caída en la concentración de AA fue más marcada en hojas maduras que en hojas jóvenes (Figura 2.9).

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, la liberación de H_2O_2 *in vivo* no se ha visto modificada sustancialmente (Figura 2.5), independientemente de la edad de la hoja o del tratamiento con etefón. Algunos trabajos relacionados a este tema, asocian el aumento de la producción de peróxidos con un aumento en el contenido de glutatión (Queval, *et al.*, 2009; Dixon, *et al.* 1998); como así también mencionan la acción que puede provocar el etileno sobre transferasas del GSH (GST) (Itzhak, *et al.*, 1994; Meyer, *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2003; Zhou & Goldsbrough, 1993). Las GSTs son una superfamilia de enzimas que realizan la conjugación del grupo tiol del GSH hacia otros compuestos electrofílicos (Ticket & Lu, 1989). Las GSTs vegetales son las encargadas de conjugar en GSH con distintos grupos de herbicidas para poder destoxificar a las células (Wiegand *et al.*, 1986; Timmerman, 1989). También se las ha relacionado a una serie de respuestas como resistencia a herbicidas (Cummins *et al.*, 1999; Wiegand *et al.*, 1986), auxinas (Smith *et al.*, 2003; Droog *et al.*, 1993) y ataques de patógenos (Dean *et al.*, 2005; Dudler *et al.*, 1991).

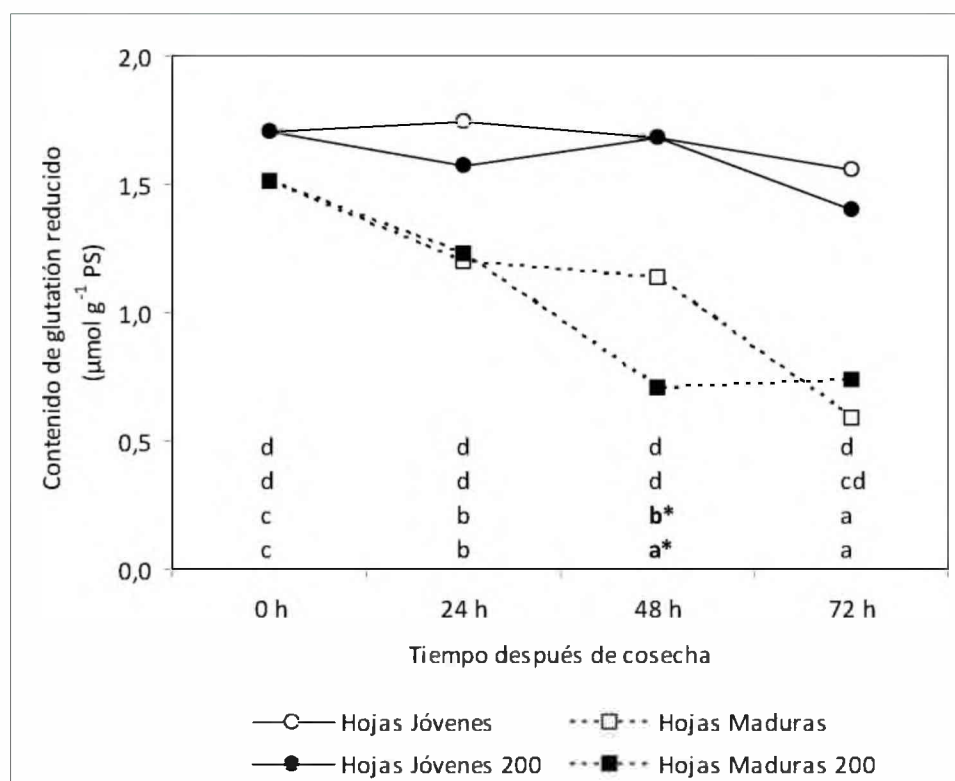


Figura 2.14 Contenido de GSH en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

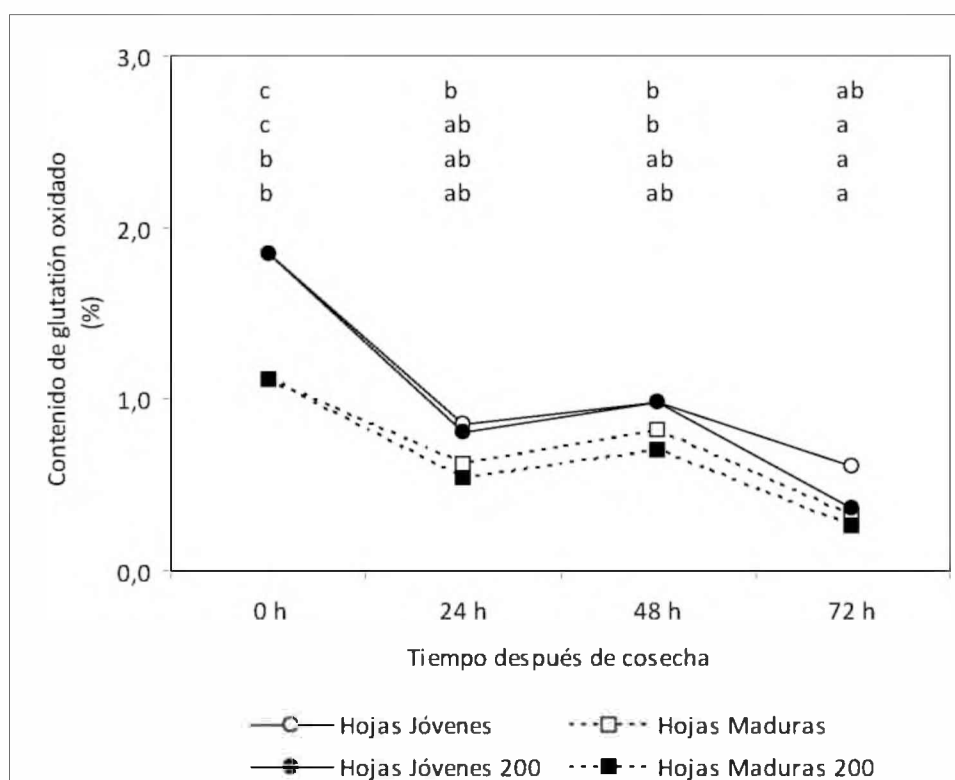


Figura 2.15 Contenido de GSSG (%) en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

Dentro de los antioxidantes en medios liposolubles, consideraremos al γ - y al α -tocoferol. El primero es el precursor del segundo, ya que el γ -tocoferol es convertido a α -tocoferol por medio de la enzima γ -tocoferolmetiltransferasa, utilizando al S-adenosilmetionina como dador del grupo metilo (Collakova & DellaPenna, 2003; Bergmüller, *et al.*, 2003). Dentro de las hojas, casi el 90 % del α -tocoferol se encuentra en la membrana tilacoidal, destoxificando EAO que se producen durante la fotosíntesis, actuando en conjunto con el AA y el GSH en medios hidrosolubles (Foyer & Noctor, 2003). La biosíntesis de los tocoferoles aumenta durante la senescencia foliar (Rise, *et al.* 1989; Falk, *et al.*, 2003; Abbasi, *et al.*, 2007; Mishina, *et al.*, 2007), y se hipotetiza que podría estar formandose a partir de los productos de la degradación de la clorofila (Ischebeck, *et al.*, 2006; Valentin, *et al.*, 2006). En algunos trabajos se ha reportado que el γ -tocoferol predomina en hojas senescentes, pero sin embargo la mayoría muestran que el α - tocoferol es el dominante (Falk *et al.*, 2003; Mishina *et al.*, 2007). El incremento en la cantidad de tocoferoles sintetizados podría estar implicado en la protección contra la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, que son liberados de las membranas tilacoidales de hojas senescentes por acción de las lipasas y las lipooxigenasas (Thompson *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 2001; He & Gan, 2002; Kaup *et al.*, 2002).

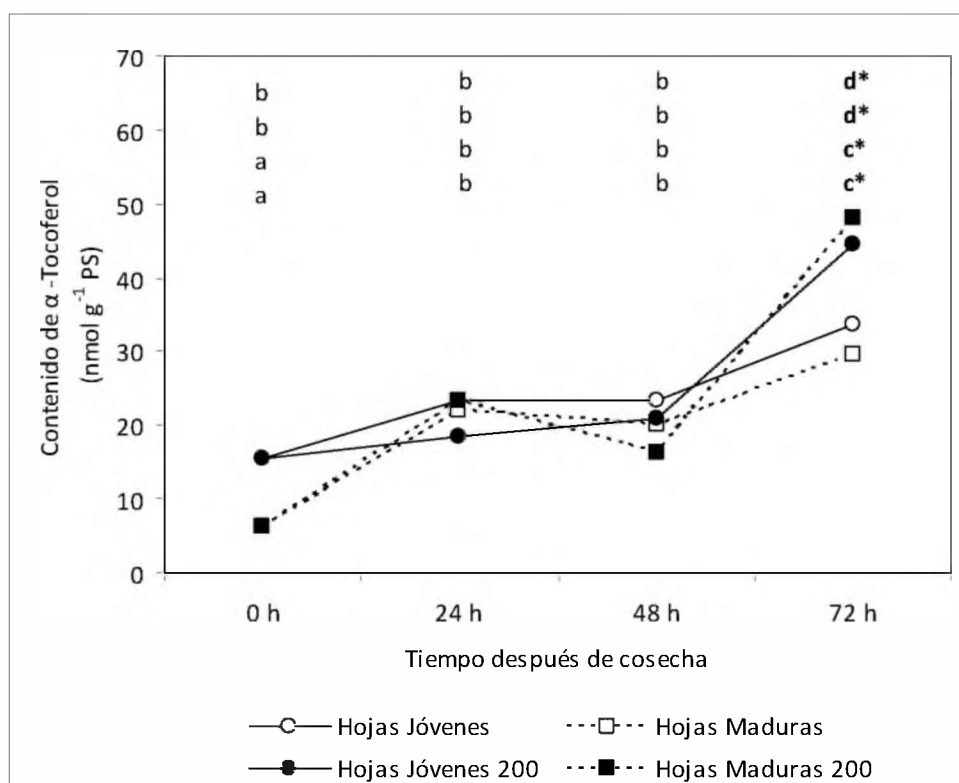


Figura 2.16 Contenido de α -tocoferol en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

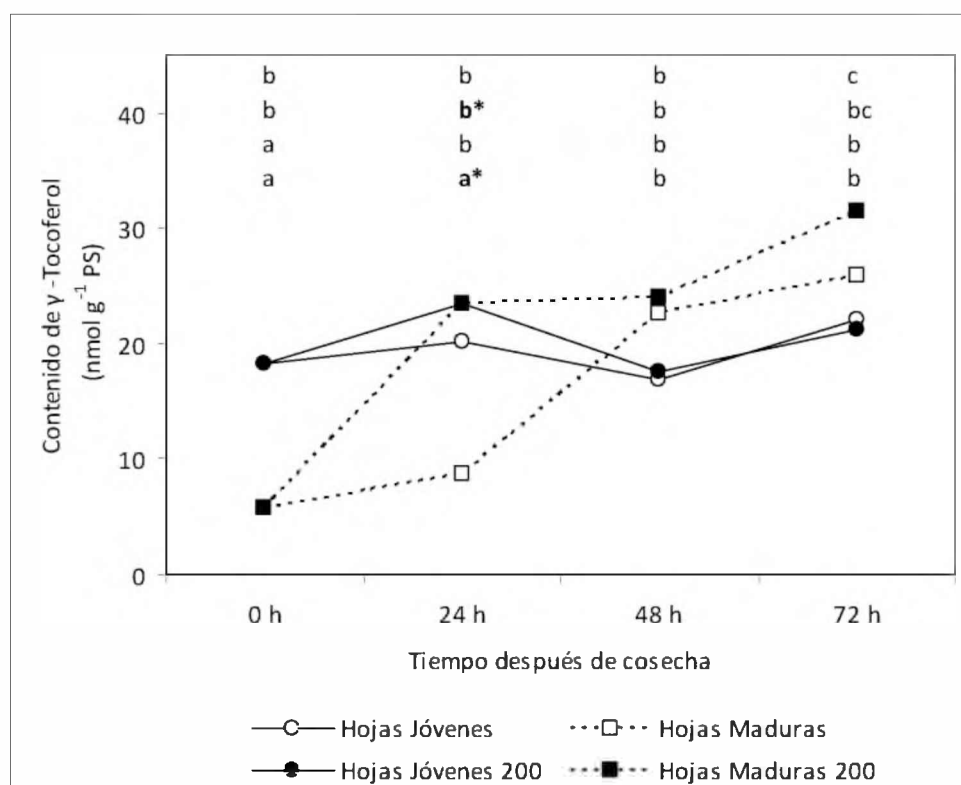


Figura 2.17 Contenido de γ -tocoferol en hojas jóvenes y maduras de espinaca con y sin la aplicación de 200 ppm de etefón. Las letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$).

En los experimentos llevados a cabo en esta tesis, se ha visto un aumento significativo del contenido de α -tocoferol tanto en hojas jóvenes (118 %) como maduras (381%) sin tratamiento con etefón a las 72 h de haber sido almacenadas en oscuridad (Figura 2.16). Por otro lado, las hojas jóvenes y maduras tratadas con 200 ppm de etefón a las 72 h mostraron diferencias significativas respecto de sus controles respecto del contenido de este antioxidante (Figura 2.16).

Por otro lado, el contenido de γ -tocoferol no se vio modificado en las hojas jóvenes con y sin tratamiento con etefón, a lo largo de todo el experimento, manteniéndose en un nivel promedio de 19 nmol gr⁻¹ PS. Sin embargo, las hojas maduras mostraron un aumento en el contenido de γ -tocoferol de más de 5 veces el contenido inicial (447%) (Figura 2.17), lo que estaría indicando que en las hojas maduras se habrían estado iniciando los procesos de senescencia, que se evidencian en la disminución del contenido de clorofila recién a las 72 h (Figura 2.1).

A partir de los trabajos de Kanwischer *et al.* (2005) con mutantes de *Arabidopsis thaliana* (*vte1*), que subexpresan la enzima encargada de la síntesis de γ -tocoferol, se encontró que el contenido de ácido ascórbico y de glutatión se vieron incrementados, lo que podría estar indicando un efecto compensador entre antioxidantes liposolubles (Vitamina E) e hidrosolubles (AA y GSH). Sin embargo, Colville & Smirnoff (2008) trabajando con mutantes de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh que poseen menores contenidos foliares de ácido ascórbico (*vtc1* y *vtc2*), no encontraron diferencias en el contenido de α -tocoferol comparados con silvestres. A partir de los datos hallados en los experimentos de espinaca, se observa que durante la senescencia inducida por la oscuridad y el etileno, se produce un efecto compensador entre estos dos grandes grupos de antioxidantes. Cuando los niveles de AA tienden a reducirse a un mínimo (Figura 2.9), el contenido de α -tocoferol tiende a un máximo (Figura 2.16). Este tema se retomará en el próximo capítulo para ver más en particular la participación del etileno en este balance entre antioxidantes.

4.3 Capítulo III

4.3 Capítulo III

4.3.1 Caracterización del contenido de antioxidantes de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta diferencial al etileno

Se ha observado en la presente tesis (Capítulo II) que el contenido de AA en espinacas se ve fuertemente influenciado por el etileno. Para caracterizar mejor esta interacción hormona-antioxidante se decidió utilizar plantas de *Arabidopsis* con mutaciones que modifican la respuesta de las mismas al etileno. Esta hormona constituye una de las moléculas más simples con un papel vital en el desarrollo de los vegetales y es el mediador de la mayoría de las señales del ambiente (Abeles *et al.*, 1992; Johnson & Ecker, 1998). A pesar que la mayor parte de los estudios llevados a cabo en el tema se ha centrado en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, se ha visto un gran nivel de conservación en otras especies estudiadas (Klee, 2004).

Dentro de la cadena de señalización, el primer paso está constituido por los receptores celulares específicos que interaccionan con el etileno. Por sus características fisicoquímicas, el etileno es molécula simple y de gran difusibilidad a través de las membranas biológicas. Existe una gran afinidad entre los receptores y el etileno, utilizando al Cu^{++} como ligando entre los dominios hidrofóbicos de los receptores y la hormona (Hirayama & Alonso, 2000; Bleeker, 1999; Bleeker & Kende, 2000). La mutación de estos centros hidrofóbicos de los cinco receptores en *Arabidopsis* - ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 y ERS2 - produce un mutante totalmente insensible al etileno (Hua *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 1998). En la cadena de señalización se produce una reacción proteína-proteína con otro regulador negativo, CTR1 (Gao *et al.*, 2003). El mutante *ctr1* presenta respuesta constitutiva al etileno (Gao *et al.*, 2003), dando un fenotipo característico con una inhibición en la elongación del hipocótilo y de la radícula y una excesiva curvatura del ápice (Gou & Ecker, 2004).

Siguiendo con la cadena de reacciones, cuando el etileno interacciona con los receptores, el complejo formado por receptor-CTR1, que se encuentra en el retículo endoplasmático, inactiva a EIN2, el primer componente positivo de la cadena

(Etheridge, *et al.*, 2005). Los mutantes con pérdida de función *ein2* presentan una total insensibilidad a la acción del etileno, lo que indica que este elemento es esencial en la cadena de respuesta del etileno (Alonso *et al.*, 1999). EIN2 se encuentra asociado a una membrana desconocida y activa EIN3 que es un factor de transcripción que se acumula en el núcleo en presencia de etileno (Stepanova & Ecker, 2000). De la misma manera que *ein2*, existe una marcada reducción en la sensibilidad a la presencia del etileno en el mutante *ein3*, indicado su gran importancia en otro paso de la cadena de señalización y respuesta. La estabilización de EIN3 es resultado de numerosas activaciones de genes, que regulan varias vías de señalización (Alonso & Stepanova, 2004). Dentro de estas vías relacionadas, se puede mencionar al efecto del etileno sobre el control del crecimiento vegetativo mediado por el fitocromo (Foo *et al.*, 2006) y la respuesta modulada por azúcares (Chow & McCourt, 2006).

En el desarrollo del Capítulo II de la presente tesis se ha mostrado el efecto que tuvo el etileno sobre la síntesis y acumulación de antioxidantes en las hojas de espinaca durante el almacenamiento en oscuridad. En este capítulo se discute la evolución de los antioxidantes durante el almacenamiento en oscuridad de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta constitutiva (*ctr1-1*) y de insensibilidad al etileno (*ein2-1*, *ein3-1*, *ein4*)

4.3.2 Variación de los parámetros de senescencia sobre mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta constitutiva e insensibilidad al etileno

Dentro de los parámetros de senescencia clásicos se evaluaron el contenido de clorofila y F_v/F_m . Además se evaluaron como parámetros de estrés oxidativo la actividad de catalasa y la liberación de peróxido de hidrógeno *in vivo*.

Con respecto a los parámetros de senescencia se puede observar en la Tabla 3.1 que durante el almacenamiento en oscuridad, las hojas de *ctr1-1* redujeron su contenido de clorofila respecto del silvestre, disminuyendo en un 25 %. La misma tendencia se observa al analizar F_v/F_m . El resto de los mutantes ensayados no mostraron diferencias significativas respecto del silvestre ni al momento de cosecha ni

a las 72 h de haber almacenado las hojas en oscuridad.

Lineas mutantes de <i>Arabidopsis</i>	Contenido de clorofila ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PF)		F_v/F_m	
	0 h	72 h	0 h	72 h
Silvestre	1,16 \pm 0,05	0,91 \pm 0,07	0,849 \pm 0,004	0,806 \pm 0,006
<i>ein2-1</i>	1,23 \pm 0,05	1,16 \pm 0,06	0,846 \pm 0,002	0,811 \pm 0,010
<i>ein3-1</i>	1,15 \pm 0,04	1,11 \pm 0,04	0,849 \pm 0,003	0,818 \pm 0,005
<i>ein4</i>	1,04 \pm 0,04	0,80 \pm 0,08	0,845 \pm 0,005	0,805 \pm 0,009
<i>ctr1-1</i>	1,33 \pm 0,16	0,68 \pm 0,05*	0,871 \pm 0,009	0,747 \pm 0,005*

Tabla 3.1 Contenido de clorofila y F_v/F_m en hojas maduras de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta diferencial al etileno al momento de cosecha (0 h) y a los 3 d de haber sido cortadas y almacenadas en oscuridad a 23 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas silvestres (ANOVA $P \leq 0,05$)

En la Tabla 3.2 se presentan los datos de la evolución del estrés oxidativo. La actividad de CAT es mayor en *ein3-1* y *ctr1-1*, mientras que *ein4* mostró valores por debajo del silvestre al momento de cosecha de las hojas. A las 72 h de almacenadas las hojas en oscuridad, solo *ein2-2*, *ein3-1* y *ctr1-1* presentaron un incremento en la actividad de CAT. Por otro lado, la producción de H_2O_2 *in vivo* se vio disminuida en *ctr1-1* al momento de cosecha de las hojas, hecho que coincide con el aumento de la actividad de CAT. Sin embargo este efecto no se vio en *ein2-2* y *ein3-1*.

Estos resultados indican que no existe una relación directa entre el estrés oxidativo y la señalización por etileno durante la senescencia inducida por oscuridad en hojas cortadas de *Arabidopsis* durante los primeros 3 d.

Lineas mutantes de <i>Arabidopsis</i>	Actividad de catalasa ($\mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1} \text{clorofila min}^{-1}$)		Liberación de H_2O_2 <i>in vivo</i> ($\mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1} \text{clorofila h}^{-1}$)	
	0 h	72 h	0 h	72 h
Silvestre	0,40 \pm 0,04	0,68 \pm 0,11	115 \pm 23	56 \pm 9
<i>ein2-1</i>	0,41 \pm 0,04	0,89 \pm 0,08*	110 \pm 12	83 \pm 3*
<i>ein3-1</i>	0,85 \pm 0,04*	0,83 \pm 0,06*	123 \pm 10	93 \pm 11*
<i>ein4</i>	0,47 \pm 0,03	0,64 \pm 0,07	102 \pm 14	55 \pm 5
<i>ctr1-1</i>	1,01 \pm 0,04*	0,84 \pm 0,03*	59 \pm 10*	49 \pm 11

Tabla 3.2 Actividad de catalasa y liberación de H_2O_2 *in vivo* de hojas maduras de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta diferencial al etileno al momento de cosecha (0 h) y a los 3 d de haber sido almacenadas en oscuridad a 23 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas silvestres (ANOVA $P \leq 0,05$)

Se sabe que la sensibilidad al etileno se encuentra directamente relacionada con la edad de las hojas (Hensel *et al.*, 1993; Grbic & Bleeker, 1995; Jing *et al.*, 2002). En el mutante *ctr1-1* presenta una continua activación de la vía de señalización del etileno y presenta una acelerada tasa de senescencia cuando se lo compara con el silvestre (Hensel *et al.*, 1993). Sin embargo, aplicaciones exógenas de etileno sobre *ctr1-1* produjeron menor tasa de amarillamiento de hojas cuando se las comparó con las del silvestre, siendo las hojas adultas más afectadas que las jóvenes (Jing *et al.*, 2005). Es sabido que el etileno no desencadena la senescencia, sino que actúa como un acelerador del proceso (Grbic & Bleeker, 1995). Es también posible que desde el punto de vista evolutivo, las hojas maduras sean las más afectadas por el etileno (Jing *et al.*, 2005). En los ensayos llevados a cabo en la presente tesis, ante la ausencia de etileno, las hojas maduras de *ctr1-1* mostraron una tasa de senescencia mayor que el silvestre cuando fueron almacenadas en oscuridad, hecho que estaría de acuerdo con lo postulado por Grbic & Bleeker (1995).

4.3.3 Variación del contenido de antioxidantes hidrosolubles en mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh con respuesta constitutiva e insensibilidad al etileno

El AA es cofactor de numerosas enzimas (Arrigoni & De Tullio, 2000; De Tullio *et al.*, 1999) y contribuye a la detoxificación de las EAO en la célula (Smirnoff & Wheeler, 2000; Conklin, 2001; Conklin & Barth, 2004). También se lo ha relacionado con la posible regulación de la senescencia y con la defensa de las plantas contra patógenos (Pastori *et al.*, 2003; Barth *et al.*, 2004; Pavet *et al.*, 2005). A su vez, se ha sugerido que su acumulación podría estar afectada por el etileno (Hodges & Forney, 2000). En el capítulo II se ha demostrado que la disminución en la concentración de AA se produce antes de que los parámetros clásicos de senescencia se vean afectados. A partir de la utilización de mutantes de etileno se quiso determinar si existía una dependencia entre la senescencia y la disminución del AA. Por ello, los datos de contenidos de antioxidantes fueron calculados en base al contenido de clorofila para demostrar su asociación con la sensibilidad al etileno y no con el estado o evolución de la senescencia foliar de cada uno de los mutantes.

La Tabla 3.3 muestra que las hojas maduras de *ein2-1*, *ein3-1* y *ein4* presentan mayores contenidos de AA mientras que *ctr1-1* presenta un valor menor al silvestre al inicio de los experimentos. Luego que son cortadas las hojas mostraron una disminución importante del contenido de AA durante la senescencia inducida por la oscuridad en plantas silvestres y el mutante *ein2-1* pero no en los mutantes *ein3-1* y *ein4* a los 3 d de cortadas y almacenadas en oscuridad. Este mantenimiento de altos niveles de AA después del almacenamiento en oscuridad sugiere que la acumulación de este antioxidante está más fuertemente asociado a las proteínas EIN3 y EIN4 que a EIN2. Esta menor respuesta del mutante *ein2-1* puede estar relacionada con efectos pleiotrópicos, debido a que se encuentra relacionado con otras vías de señalización (v.g. ácido jasmónico).

Por otro lado, en el silvestre y *ctr1-1* el nivel de reducción de AA fue similar durante el almacenamiento en oscuridad, lo que estaría indicando que la vía de señalización del etileno estaría saturada en las hojas y que no se detectarían más

cambios en el mutante *ctr1-1*. Estos datos concuerdan con los hallados por Leclercq *et al.* (2002), donde aplicaciones de etileno exógenas no produjeron cambios en el mutante *ctr1-1* respecto de la longitud del hipocótilo o de la curvatura del gancho apical, dos de las características típicas de la triple respuesta al etileno (Chen *et al.*, 2005).

Con respecto al estado redox del AA, solamente en las hojas del mutante *ctr1-1* se vio un aumento altamente significativo a las 72 h de almacenamiento en oscuridad. Es decir, que casi el 50 % del AA se encuentra en este mutante en la forma oxidada.

Lineas mutantes de <i>Arabidopsis</i>	Contenido de AA ($\mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1}$ clorofila)	Contenido de DHA (%)	Contenido de AA ($\mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1}$ clorofila)	Contenido de DHA (%)
	0 h		72 h	
Silvestre	4,4 \pm 0,11	19,5 \pm 3,3	2,4 \pm 0,08	29,5 \pm 5,0
<i>ein2-1</i>	8,2 \pm 0,15*	17,5 \pm 3,4	4,0 \pm 0,21*	27,7 \pm 6,0
<i>ein3-1</i>	6,1 \pm 0,01*	21,0 \pm 2,9	5,3 \pm 0,47*	27,7 \pm 3,2
<i>ein4</i>	9,9 \pm 0,70*	17,0 \pm 1,7	8,5 \pm 0,36*	20,0 \pm 4,6
<i>ctr1-1</i>	2,9 \pm 0,37*	27,7 \pm 7,3	1,8 \pm 0,03*	49,8 \pm 4,7*

Tabla 3.3 Contenido de AA y DHA (%) en hojas maduras de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta diferencial al etileno al momento de cosecha (0 h) y a los 3 d de haber sido almacenadas en oscuridad a 23 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas silvestres (ANOVA $P \leq 0,05$)

Los resultados del contenido de AA coinciden con la actividad de la enzima encargada de la síntesis de AA, como así también de las que convierten a la forma reducida el AA oxidado. Como se puede ver en la Tabla 3.4, la GLDH incrementó su actividad en *ein3-1* respecto del silvestre, mostrando aumentos significativos también en DHAR y MDHAR. Asimismo, *ctr1-1* presenta fuertemente disminuida la actividad de DHAR al momento de corte de las hojas y de MDHAR a las 72 h de almacenamiento en oscuridad.

Lineas mutantes de <i>Arabidopsis</i>	GLDH (nmol μg^{-1} clorofila min^{-1})		DHAR ($\mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1}$ clorofila min^{-1})		MDHAR ($\mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1}$ clorofila min^{-1})	
	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h
Silvestre	78,0 \pm 18,8	55,6 \pm 8,2	1,72 \pm 0,09	1,91 \pm 0,18	0,59 \pm 0,04	0,61 \pm 0,02
<i>ein2-1</i>	95,5 \pm 21,3	87,3 \pm 20,9*	2,25 \pm 0,07*	2,36 \pm 0,14	0,66 \pm 0,12	0,54 \pm 0,13
<i>ein3-1</i>	116,1 \pm 18,0*	76,0 \pm 14,7*	2,10 \pm 0,23*	2,86 \pm 0,13*	0,88 \pm 0,22*	0,84 \pm 0,05*
<i>ein4</i>	99,5 \pm 6,1	70,0 \pm 12,7*	2,67 \pm 0,16*	4,42 \pm 0,9*	0,49 \pm 0,10	0,59 \pm 0,03
<i>ctr1-1</i>	78,8 \pm 13,8	32,7 \pm 16,8	0,89 \pm 0,18*	1,71 \pm 0,32	0,69 \pm 0,08	0,26 \pm 0,06*

Tabla 3.4 Actividad de GLDH, MDHAR y DHAR en hojas maduras de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta diferencial al etileno al momento de cosecha (0 h) y a los 3 d de haber sido almacenadas en oscuridad a 23 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas silvestres (ANOVA $P \leq 0,05$).

En relación a la cadena de reacciones posteriores a la señalización con EIN3, Chow & McCourt (2006) postularon que el etileno estaría modulando la respuesta de los azúcares, que a su vez estarían determinando el crecimiento y expansión de las células. Se ha llegado a observar que la glucosa puede aumentar la degradación de EIN3, por lo que la cadena de señalización podría tener otros moduladores (Yanagisawa *et al.*, 2003). Dentro de las vías de síntesis de AA, la más importante es la propuesta por Wheeler *et al.* (1998) en donde la D-glucosa-6-P, proveniente de la fotosíntesis, es precursor para la posterior serie de reacciones. También se ha comprobado que la sacarosa puede influir sobre la recuperación de las formas oxidadas del AA en los cloroplastos y en la biosíntesis en las mitocondrias. Por otro lado la carencia de sacarosa producida por la separación de órganos de la planta puede conducir a una degradación del contenido de AA (Nishikawa *et al.*, 2005).

Otro de los antioxidantes importantes en el balance redox de la célula es el GSH. El GSH tiene dos funciones importantes como parte de las defensas antioxidantes: en primer lugar puede reducir al DHA en una reacción catalizada por la DHAR, para formar AA (Smirnoff, 2000). Además, puede actuar donando sus electrones para detoxificar las células del H_2O_2 en una reacción catalizada por la GSH peroxidasa (Shao *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2005). Se ha reportado que el balance redox del GSH es muy importante para una serie de vías de señalización (Li & Jin, 2007).

Lineas mutantes de <i>Arabidopsis</i>	Contenido de GSH ($\mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1}$ clorofila)	Contenido de GSSG (%)	Contenido de GSH ($\mu\text{mol } \mu\text{g}^{-1}$ clorofila)	Contenido de GSSG (%)
	0 h		72 h	
Silvestre	0,15 \pm 0,054	8,05 \pm 1,34	0,60 \pm 0,011	3,07 \pm 0,80
<i>ein2-1</i>	0,23 \pm 0,041*	7,62 \pm 2,26	0,50 \pm 0,037*	3,90 \pm 0,91
<i>ein3-1</i>	0,17 \pm 0,088	7,81 \pm 2,03	0,35 \pm 0,008*	4,07 \pm 1,46
<i>ein4</i>	0,32 \pm 0,039*	9,70 \pm 1,26	0,74 \pm 0,048*	6,55 \pm 0,29*
<i>ctr1-1</i>	0,36 \pm 0,423*	8,74 \pm 1,57	0,76 \pm 0,061*	5,00 \pm 0,35*

Tabla 3.5 Contenido de GSH y GSSG (%) en hojas maduras de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta diferencial al etileno al momento de cosecha (0 h) y a los 3 d de haber sido almacenadas en oscuridad (72 h). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas silvestres (ANOVA $P \leq 0,05$).

El contenido de GSH en las hojas de plantas silvestres mostró valores más bajos que en las mutantes *ein2-1*, *ein4* y *ctr1-1* (Tabla 3.5). Sin embargo, durante el almacenamiento en oscuridad todos los genotipos aumentaron su contenido de GSH aunque el aumento fue más pronunciado en el silvestre. Con respecto al estado redox, no se detectaron cambios significativos, a excepción de *ein4* y *ctr1-1*. Estos dos mutantes a las 72 h presentaron valores de más de 2,1 y 1,6 veces en relación a las plantas silvestres, respectivamente. Por otro lado, en estos dos genotipos se detectaron los valores más altos del contenido de GSH. Las diferentes respuestas experimentadas en los mutantes (Tabla 3.4) en la acumulación de GSH y su estado redox ponen en evidencia la modulación de este antioxidante mediada por el etileno.

4.3.4 Variación del contenido de antioxidantes liposolubles en mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta constitutiva e insensibilidad al etileno

Los tocoferoles cumplen la función de antioxidantes no enzimáticos en los medios lipofílicos y su ausencia produce aumentos en el contenido de MDA conjuntamente con una activación de las defensas de las plantas (Maeda & DellaPena, 2007). Los tocoferoles son sólo producidos en los cloroplastos (Horvath *et al.*, 2006), y se encuentran distribuidos entre las diversas membranas de los cloroplastos (tilacoidales y

estromáticas) (Soll *et al.*, 1985). Hasta la fecha no se ha estudiado el efecto que pueda tener el etileno sobre el aumento de su síntesis.

De la misma manera que con los contenidos de AA y GSH, el contenido de α - y γ -tocoferoles se han expresado en función del contenido de clorofila en vez de utilizar como referencia al PF para discernir entre los efectos del etileno y la senescencia.

Se han evaluado en esta sección los contenidos de los dos tocoferoles más abundantes en las hojas, que son el α - y el γ -tocoferol. Como se puede observar en la Tabla 3.6, el contenido de α - y γ -tocoferol se ve fuertemente incrementado en *ein4* y *ctr1-1* al momento de cosecha de las hojas, manteniéndose estas diferencias al cabo de 72 h de almacenamiento en oscuridad solamente para el contenido de α -tocoferol en estos mismos mutantes. El mutante *ein3-1* presentó mayores contenidos de α - y γ -tocoferol al momento de la cosecha, pero a las 72 h los contenidos de ambos fueron similares al silvestre.

Lineas mutantes de <i>Arabidopsis</i>	Contenido de	Contenido de	Contenido de	Contenido de
	α -Tocoferol	γ -Tocoferol	α -Tocoferol	γ -Tocoferol
	(nmol μg^{-1} clorofila)	(nmol μg^{-1} clorofila)	(nmol μg^{-1} clorofila)	(nmol μg^{-1} clorofila)
	0 h		72 h	
Silvestre	34,9 \pm 0,7	21,4 \pm 1,9	68,3 \pm 11,4	54,4 \pm 4,9
<i>ein2-1</i>	37,8 \pm 1,2	19,4 \pm 0,4	69,2 \pm 4,0	43,1 \pm 6,8*
<i>ein3-1</i>	42,5 \pm 1,5*	53,7 \pm 1,4*	63,7 \pm 10,8	53,9 \pm 5,1
<i>ein4</i>	50,3 \pm 6,8*	36,8 \pm 1,9*	115,7 \pm 11,7*	99,1 \pm 8,6*
<i>ctr1-1</i>	52,0 \pm 8,4*	23,4 \pm 2,5	168,7 \pm 20,0*	94,1 \pm 8,2*

Tabla 3.6 Contenido de α - y γ -Tocoferol en hojas maduras de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta diferencial al etileno al momento de cosecha (0 h) y a los 3 d de haber sido almacenadas en oscuridad a 23 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas silvestres (ANOVA $P \leq 0.05$)

Por otro lado, con los datos de la Tabla 3.6 ordenados en las abscisas los contenidos de γ -tocoferol y en las ordenadas los de α -tocoferol, se procedió a hacer un análisis de correlación entre estos dos parámetros para cada uno de los mutantes estudiados.

Como se puede observar, los mutantes insensibles a la respuesta del etileno (*ein2-1*, *ein3-1* y *ein4*) mostraron un bajo porcentaje de correlación en la relación de ambos

tocoferoles (Figuras 3.2, 3.3 y 3.4); sin embargo, el genotipo silvestre y el *ctr1-1* mostraron una alta correlación entre ambos tocoferoles (Figuras 3.1 y 3.5).

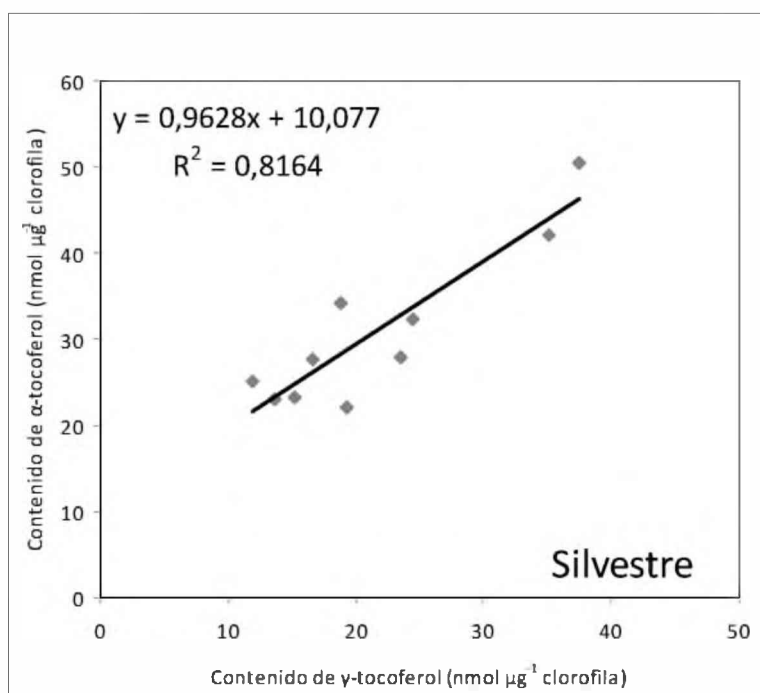


Figura 3.1 Correlación entre el contenido de α - y γ -tocoferoles en plantas Silvestres de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

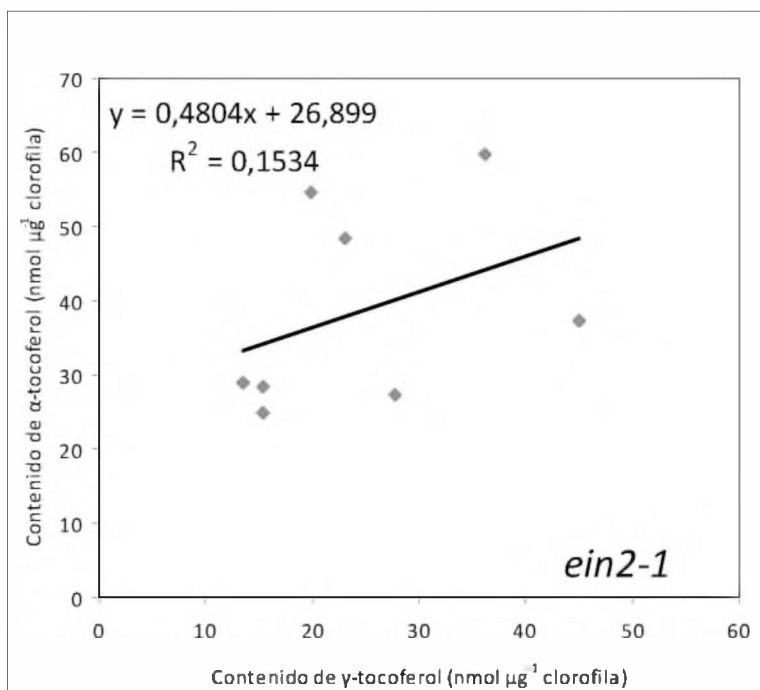


Figura 3.2 Correlación entre el contenido de α - y γ -tocoferoles en plantas mutantes de *ein2-1* de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

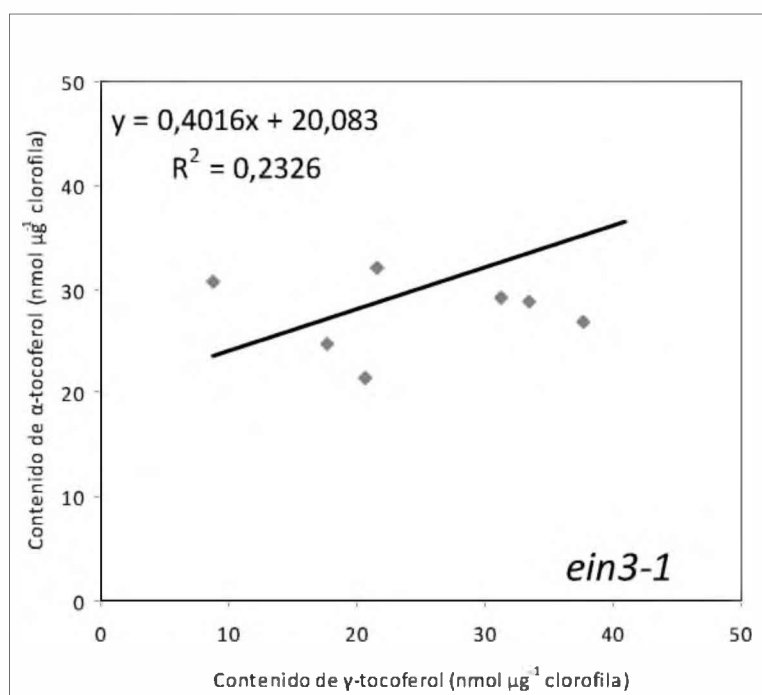


Figura 3.3 Correlación entre el contenido de α - y γ -tocoferoles en plantas mutantes de *ein3-1* de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

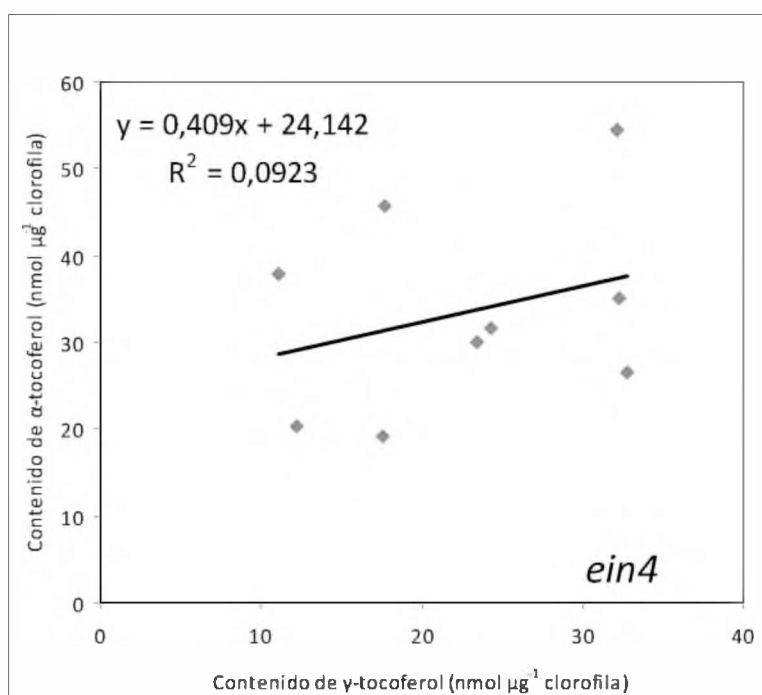


Figura 3.4 Correlación entre el contenido de α - y γ -tocoferoles en plantas mutantes de *ein4* de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

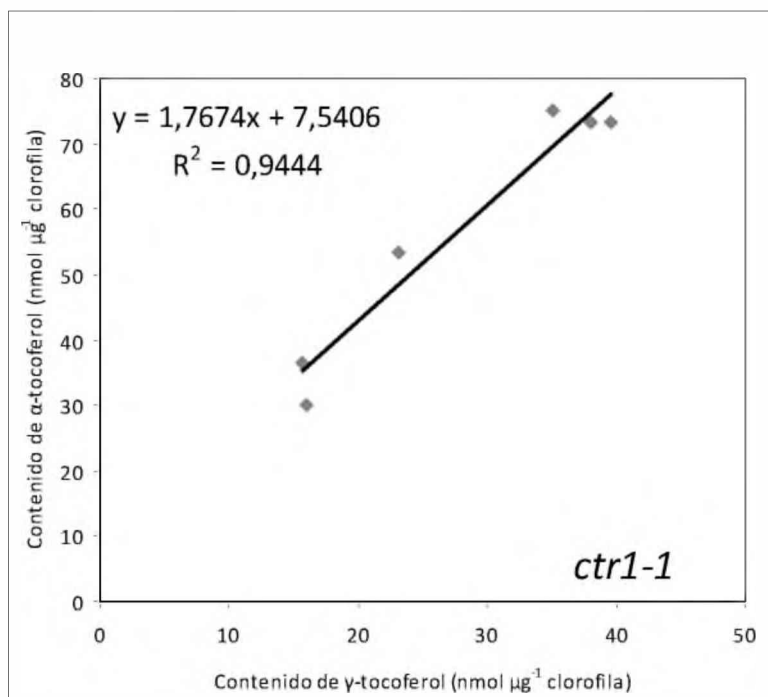


Figura 3.5 Correlación entre el contenido de α - y γ -tocoferoles en plantas mutantes de *ctr1-1* de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Es posible que esta correlación entre los contenidos de tocoferoles sugiera que la acumulación α - y γ -tocoferoles se encuentre mediada por el etileno. Como se ha mencionado en la introducción, el γ -tocoferol es el precursor del α -tocoferol, que se forma por medio de la metilación catalizada por la enzima γ -tocoferol-metil-transferasa (Maeda & DellaPena, 2007). De esta manera esta enzima podría llegar a estar controlada por efecto del etileno. Se debe tener en cuenta que la γ -tocoferol-metil-transferasa utiliza como dador del grupo metilo al S-adenosilmetionina (Maeda & DellaPena, 2007), el cual es el uno de los precursores de la síntesis de etileno (Wang *et al.*, 2002). Sin embargo no es de descartar que el etileno podría estar actuando aguas arriba en la cadena de síntesis de los tocoferoles (Li *et al.*, 2010). Por lo tanto se requerirá de más trabajo respecto de las diferentes enzimas que actúan sobre la síntesis de estos antioxidantes importantes en los medios lipofílicos de las células.

El aumento en el contenido de tocoferoles ha sido observada durante la senescencia inducida por oscuridad en hojas de espinaca (Gómez *et al.*, 2008). La acumulación de α -tocoferol en órganos senescentes ha sido relacionada con la degradación de clorofila en hojas (Rise *et al.*, 1989), como así también se han detectado aumentos en su contenido después de largos períodos de almacenamiento en órganos como tubérculos (Spychalla & Desborough, 1990).

Kanwischer *et al.* (2005) trabajando con mutantes de *A. thaliana* (*vte1*) que

subexpresan la enzima encargada de la síntesis de γ -tocoferol, encontró que el contenido de AA y de GSH se vieron incrementados, lo que podría estar indicando un efecto compensador entre antioxidantes. Este mismo efecto podría estar ocurriendo en el caso de los mutantes *ctr1-1*, en donde bajos contenidos de AA (Tabla 3.3) coinciden con altos niveles de tocoferoles (Tabla 3.6). Asimismo, el etileno podría estar regulando la síntesis de α -tocoferol a través de la modificación en la actividad de la γ -tocoferol-metil-tranferasa.

4.4 Capítulo IV

4.4 Capítulo IV

4.4.1.1 Efecto del 1-MCP sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca durante el almacenamiento en oscuridad

Es sabido que el etileno acelera la degradación de la clorofila en una gran variedad de hortalizas de hoja (Gergoff *et al.*, 2010a; Able *et al.*, 2002; Able *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2002; Lers *et al.*, 1998; Hodges & Forney, 2000; López-Ayerra *et al.*, 1998). También se ha observado que acelera el marchitamiento de pétalos (Bartoli *et al.* 1996, Able *et al.*, 2002, Kato *et al.*, 2002), la maduración de frutos (Ruperti *et al.*, 2002; Hoeberichts *et al.*, 2002, D'Aquino *et al.*, 1998) y la senescencia en raíces (Jain *et al.*, 2006; Kukreja *et al.*, 2005).

Dentro de los inhibidores de la acción del etileno, el 1-MCP se presenta como una de las últimas herramientas para extender y mejorar la vida postcosecha en frutas y hortalizas. Watkins (2006) y Blankenship & Dole (2003) enumeran una larga lista de experiencias exitosas que ha tenido este producto y cómo se relaciona con la biosíntesis del etileno.

El 1-MCP interactúa con los receptores de etileno, previniendo la acción de esta hormona (Sisler & Serek, 1997; Sisler & Serek, 2003). El uso de ciclopropanos para inhibir la acción del etileno fue patentado por Sisler & Blankenship en 1996. La utilización comercial de los ciclopropanos se vio fuertemente fomentada debido a que el 1-MCP se presenta como un polvo que está formando un complejo con γ -ciclodextrina. El gas se libera cuando este polvo es puesto en agua y es estable a temperatura ambiente (Watkins, 2006).

La afinidad del 1-MCP con los receptores del etileno es aproximadamente 10 veces mayor que el etileno mismo, por lo que puede ser usado con gran eficiencia a muy bajas concentraciones (Blankenship & Dole, 2003). La mayoría de los trabajos realizados sobre maduración de frutos han demostrado su eficiencia y su gran especificidad (Sisler & Serek, 1999).

Dentro de las hortalizas de hoja, la espinaca se presenta un significativo contenido en vitaminas y minerales (Kader, 2002) y para que ésta sea aceptada por los consumidores debe encontrarse verde y turgente. Estos atributos son perdidos

rápidamente cuando la espinaca es almacenada en la oscuridad o en condiciones no refrigeradas (Toledo *et al.*, 2003).

De acuerdo a Yamauchi & Watada (1991), la degradación de clorofila es estimulada por el ciclo de las peroxidasas y el H_2O_2 , aumentando la peroxidación lipídica y la actividad de las clorofilasas. Este mismo autor llegó a la conclusión que bajas concentraciones de etileno (10 ppm) no afectaron la degradación de clorofilas en hojas de espinaca. Sin embargo, en el presente trabajo de tesis doctoral se determinó que concentraciones de 200 ppm de etefón sólo llegaron a afectar el contenido de clorofila en hojas maduras de espinaca a las 72 h de haber sido almacenadas en oscuridad (Gergoff *et al.*, 2010a).

Philosoph-Hadas *et al.* (1991), estudiaron el efecto del etileno y de un inhibidor de la acción del etileno, la amino-etoxivinilglicina (AVG), sobre la senescencia en espinaca. En este trabajo los autores demostraron que el corte durante la cosecha o el posterior daño a las hojas durante su manipulación desencadenan el inicio de los síntomas de senescencia, participando el etileno como un acelerador de la tasa de los procesos de degradación.

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los trabajos utilizando 1-MCP se han realizado sobre frutas (Watkins, 2006), siendo muy pocos los realizados en hortalizas de hojas, y en particular ninguno en espinaca. Por lo tanto el desarrollo de este capítulo se centrará en el efecto del 1-MCP sobre hojas maduras de espinaca para determinar el papel del etileno endógeno durante el almacenamiento en oscuridad a 23 °C. Además, se analizará el efecto de la refrigeración combinada con 1-MCP.

4.4.1.2 Efecto del 1-MCP sobre la senescencia y la producción de etileno en hojas maduras de espinaca

Dentro de los parámetros de senescencia, se considerarán la pérdida de clorofila, F_v/F_m y la fuga de solutos. A partir de los resultados obtenidos, se ha encontrado que las aplicaciones con $1,0 \mu L L^{-1}$ de 1-MCP mantuvieron el contenido de clorofila a los 3 d de haber sido almacenadas en oscuridad a 23 °C respecto del valor hallado al momento de la cosecha. A los 6 d, en las mismas hojas se observó una disminución en el contenido de clorofila, si bien este fue mayor que en las hojas control. Los tratamientos

con $0,1 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP dieron resultados intermedios, sin diferenciarse de los controles (Figura 4.1).

Por otro lado, F_v/F_m presentó la misma tendencia que la variación en el contenido de clorofila (Figura 4.2). Otros autores afirman que el F_v/F_m se presenta como una técnica muy sensible a los cambios de la estabilidad de membranas cloroplásticas (DeEll *et al.*, 1999), siendo una herramienta útil para el estudio de la senescencia foliar (Gross & Ohad, 1983). Sin embargo en este caso, no se han visto diferencias entre las dos técnicas en cuanto al nivel de sensibilidad para detectar cambios en el avance de la senescencia entre los distintos tratamientos.

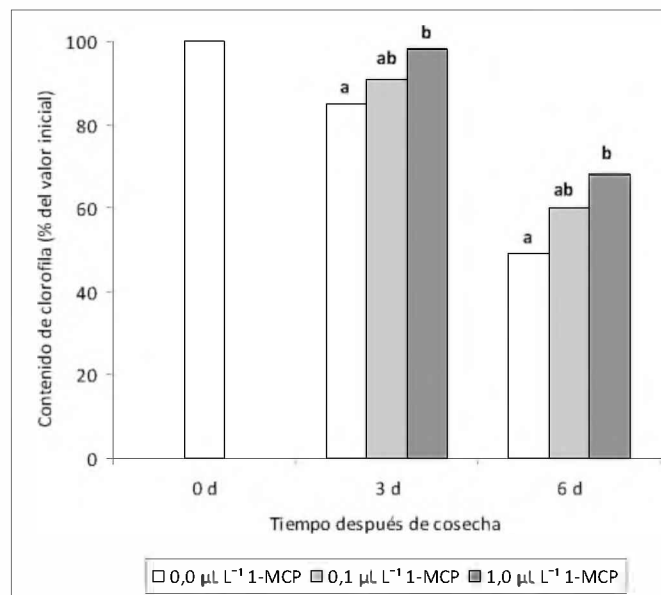


Figura 4.1 Variación del contenido de clorofila en hojas maduras de espinaca tratadas con $0,0 \mu\text{L L}^{-1}$, $0,1 \mu\text{L L}^{-1}$ y $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 23°C . El contenido inicial de clorofila fue de 34,2 unidades de SPAD. Letras distintas indican diferencias significativas para cada día de muestreo (ANOVA $P \leq 0,05$).

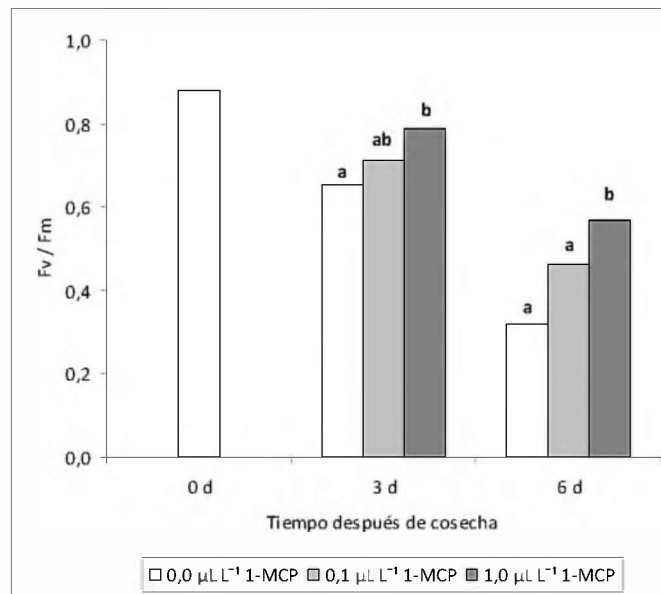


Figura 4.2 Variación del rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (F_v/F_m) en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 23 °C. Letras distintas indican diferencias significativas para cada día de muestreo (ANOVA $P \leq 0,05$).

Con respecto a la fuga de solutos, a los tres días de haber almacenado las hojas en oscuridad, no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos; mientras que a los 6 d, el control aumentó significativamente, diferenciándose del tratamiento con 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP. El tratamiento con 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP presentó un valor intermedio, no diferenciándose del control (Figura 4.3).

Estos resultados concuerdan con Lomaniec *et al.* (2003), donde aplicaciones de 1-MCP a hojas de perejil (*Petroselinum crispum* Mill.) en concentraciones del orden 0,01 $\mu\text{L L}^{-1}$ no tuvieron un efecto sobre la senescencia; inclusive ciertos procesos como la síntesis de etileno en perejil fueran acelerados. Por otro lado, está ampliamente probado que concentraciones mayores a 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP no muestran diferencias significativas (Ku & Wills, 1999), como así tampoco aplicaciones repetidas en el tiempo (Lomaniec *et al.*, 2003) sobre los parámetros de senescencia.

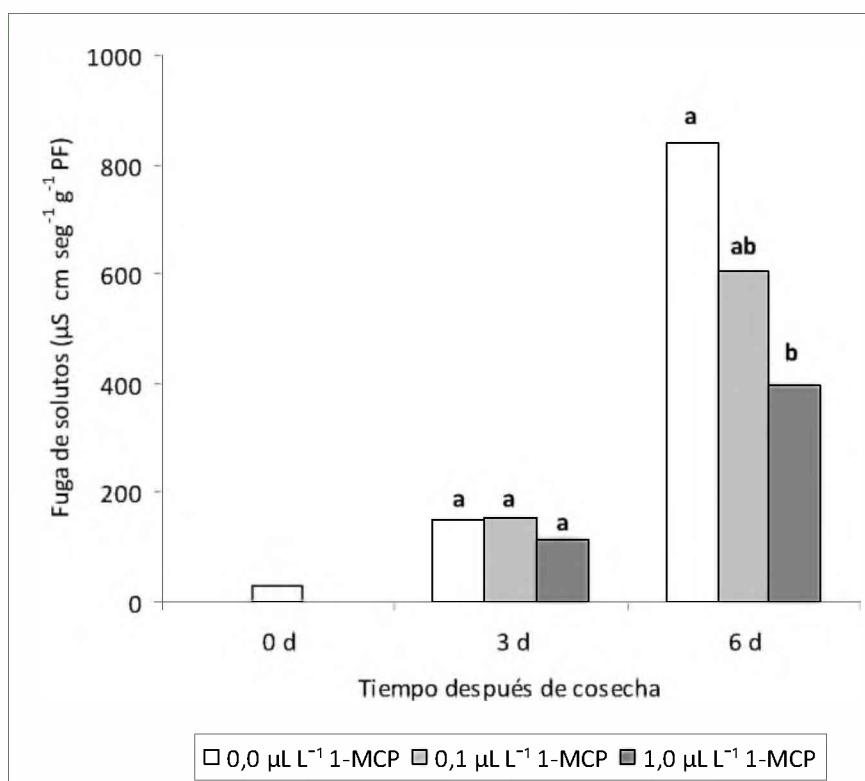


Figura 4.3 Variación de la fuga de solutos (expresado en % del valor inicial) en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 µL L⁻¹, 0,1 µL L⁻¹ y 1,0 µL L⁻¹ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 23 °C. El valor inicial de fuga de solutos fue de 30 µS cm g⁻¹ PF seg⁻¹. Letras distintas indican diferencias significativas para cada día de muestreo (ANOVA $P \leq 0,05$).

Los tratamientos con 0,1 µL L⁻¹ y 1,0 µL L⁻¹ de 1-MCP incrementaron la producción de etileno en un 60 y un 95 %, respectivamente después de 3 d de almacenamiento en oscuridad a 23 °C. A los 6 d, todos los tratamientos vuelven a valores similares a los hallados en el momento de cosecha, no detectándose diferencias significativas entre ellos (Figura 4.4). Esto ha sido reportado en otros trabajos realizados sobre hojas de otras especies, donde a pesar del retardo en la senescencia, la aplicación de 1-MCP produjo un aumento en la producción de etileno (Jiang *et al.*, 2002). Esto podría estar sugiriendo una retroalimentación positiva en la vía de síntesis del etileno. En ciertos casos este aumento de la síntesis se dio en el término de horas después de una aplicación de 1-MCP (Lomaniec *et al.*, 2003). Resultados similares fueron hallados en otros órganos cuando fueron tratados con el inhibidor del etileno (Sisler & Serek, 1997; Sisler *et al.*, 1999; Mullins *et al.*, 2000).

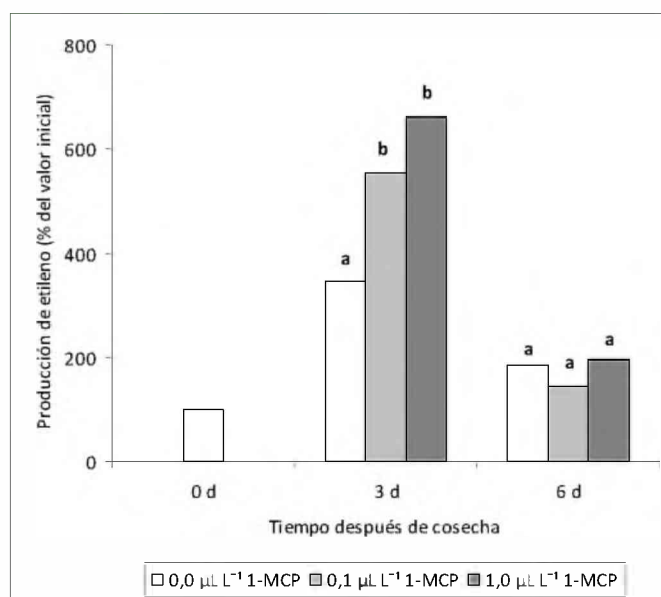


Figura 4.4 Variación de la producción de etileno (expresado en % del valor inicial) en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 µL L⁻¹, 0,1 µL L⁻¹ y 1,0 µL L⁻¹ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 23 °C. La producción inicial de etileno fue de 0,6 µL kg⁻¹ PF h⁻¹. Letras distintas indican diferencias significativas para cada día de muestreo (ANOVA $P \leq 0,05$).

4.4.1.3 Efecto del 1-MCP sobre el contenido de antioxidantes en hojas maduras de espinaca

Los contenidos de AA (Figura 4.5) y de GSH (Figura 4.7) se vieron fuertemente disminuidos durante el almacenamiento en oscuridad. A los 3 d, los contenidos de AA y GSH eran solamente del 23 y del 63 %, respectivamente, comparado con el valor determinado al momento de cosecha. Estas fuertes disminuciones en los contenidos de antioxidantes fueron amortiguadas sustancialmente por la aplicación de 1,0 µL L⁻¹ de 1-MCP. Aplicaciones con 0,1 µL L⁻¹ de 1-MCP no mostraron diferencias significativas respecto del control.

Hacia el final de los experimentos, el contenido de AA y GSH mostraron los valores más bajos con un 6 y 35 % respectivamente del valor hallado al inicio de los experimentos. Estos contenidos de antioxidantes mejoraron parcialmente con la aplicación de 1,0 µL L⁻¹ de 1-MCP (Figuras 4.5 y 4.7).

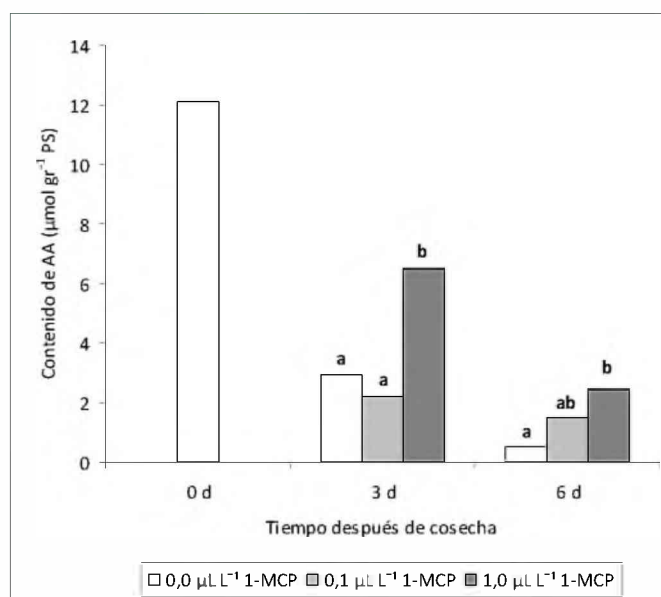


Figura 4.5 Contenido de AA en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 23 °C. Letras distintas indican diferencias significativas para cada día de muestreo (ANOVA $P \leq 0,05$).

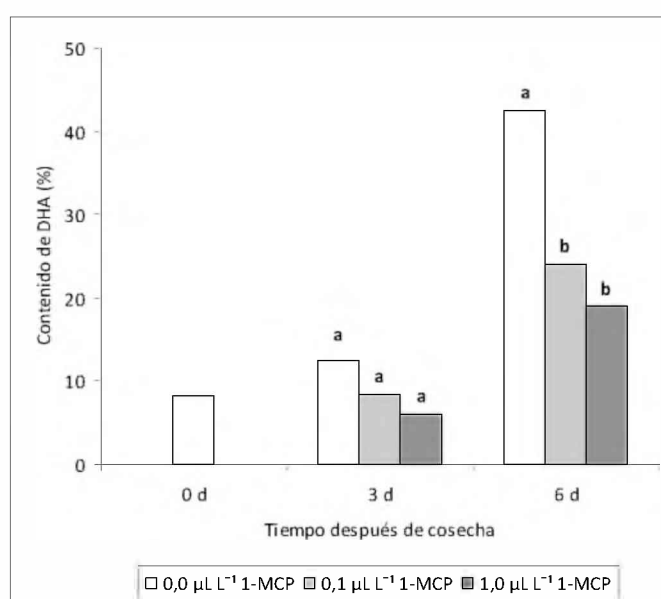


Figura 4.6 Contenido de DHA (expresado en % respecto del valor de AA total) en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 23 °C. Letras distintas indican diferencias significativas para cada día de muestreo (ANOVA $P \leq 0,05$).

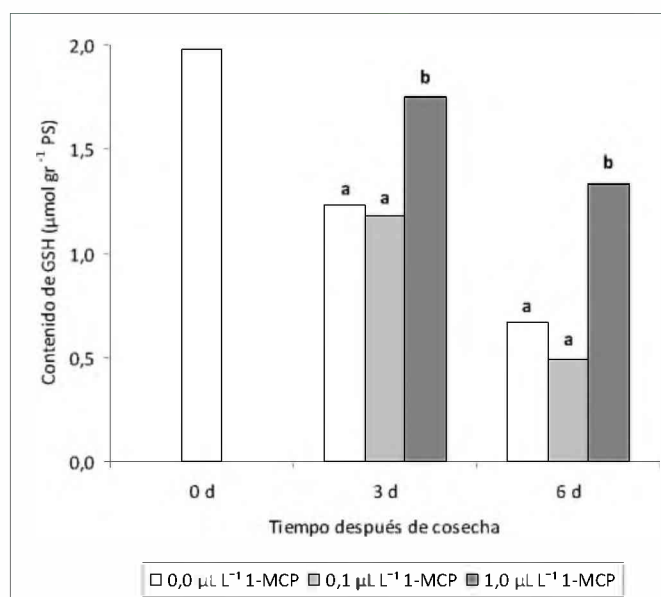


Figura 4.7 Contenido de GSH en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 23 °C. Letras distintas indican diferencias significativas para cada día de muestreo (ANOVA $P \leq 0,05$).

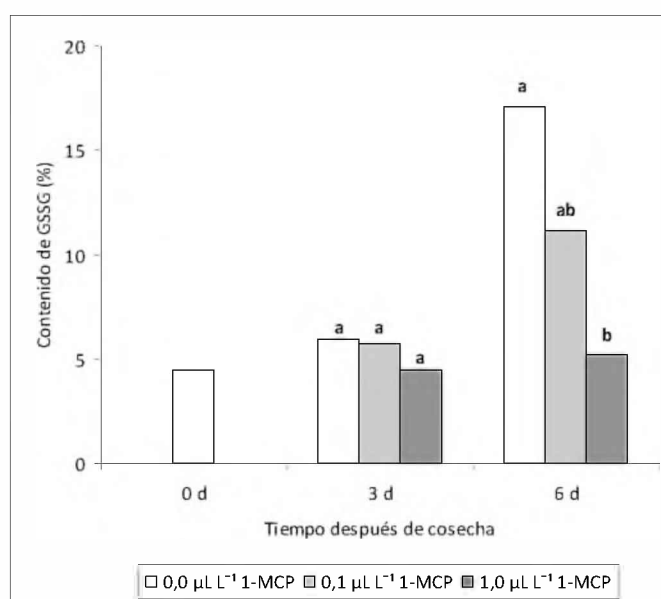


Figura 4.8 Contenido de GSSG (expresado en % respecto del valor de glutatión total) en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 23 °C. Letras distintas indican diferencias significativas para cada día de muestreo (ANOVA $P \leq 0,05$).

Por otro lado, el estado redox del AA y del GSH fue mejorado solamente a los 6 d de haber almacenado las hojas tratadas con 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP si se los compara con el valor hallado en los controles. El tratamiento con 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP no produjo cambios sustanciales en el estado redox de estos dos antioxidantes (Figuras 4.6 y 4.8).

Solamente se vio en este tratamiento una disminución del DHA % a los 6 días de almacenamiento en oscuridad.

En este mismo sentido, hay trabajos que relacionan altas concentraciones de AA con órganos en actividad o en activo crecimiento (Liso *et al.*, 1988; Innocenti *et al.*, 1990), como así también el estado redox de este antioxidante podría estar relacionado a la tasa de división celular (Tabata *et al.*, 2001). Se ha postulado que la proporción oxidado/reducido del AA podría actuar como un sensor redox ante diferentes tipos de stress ambientales (De Pinto *et al.*, 1999), lo que podría relacionarse con el efecto del etileno (Gergoff *et al.*, 2010a) (Capítulo II de la presente tesis), como así también con el efecto del 1-MCP (Gergoff *et al.*, 2010b; Capítulo IV).

En trabajos previos se ha demostrado que la aplicación de choques térmicos aumentan la vida postcosecha de hojas de espinaca (Gomez *et al.*, 2008). Sin embargo, estos tratamientos no previnieron la disminución en el contenido de antioxidantes (AA y GSH), pero sí mejoraron el estado redox de los mismos. Se ha demostrado previamente que aplicaciones de etileno producen una disminución en el contenido de antioxidantes (Hodges & Forney, 2000), inclusive en etapas muy tempranas (Gergoff *et al.*, 2010a; Capítulo II). Estos resultados sugieren que el estado redox de los antioxidantes actuaría como un modulador de la tasa de senescencia en hojas de espinaca.

4.4.2 Efecto de las bajas temperaturas y del 1-MCP sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca

Se ha demostrado que las bajas temperaturas (0 y 5 °C) mejoran las condiciones de almacenamiento de frutas y hortalizas (Paull, 1999), incluyendo a la espinaca (Cantwell & Kasmire, 2003). Bergquist *et al.* (2006) determinaron que las mejores temperaturas para mantener alto el contenido de antioxidantes se encuentran alrededor de los 2 °C, viéndose un retardo en los parámetros de senescencia y en el aspecto de las hojas de espinaca. Sin embargo, los ensayos llevados a cabo en esta tesis se han realizado a 4 °C, por encontrarse disponible en el laboratorio una cámara fría a esa temperatura.

Está demostrado que aplicaciones de 1-MCP han aumentado exitosamente la vida postcosecha del perejil (*Petroselinum crispum* Mill.) (Lomaniec *et al.*, 2003) y del coriandro (*Coriandrum sativum* L.) (Jiang *et al.*, 2002) cuando fueron almacenadas entre 20 y 25 °C, coincidiendo con los resultados hallados en esta tesis sobre hojas de espinaca (Figuras 60, 61 y 62). Sin embargo, tratamientos con 1-MCP a 5 °C no han resultado tan prometedores, debido a la poca sensibilidad del coriandro a este gas (Jian *et al.*, 2002).

A partir de estos antecedentes se procedió a determinar el efecto de las bajas temperaturas y la aplicación de 1-MCP en la vida postcosecha de hojas de espinaca almacenadas en oscuridad. Dentro de los parámetros de senescencia, el contenido de clorofila se vio fuertemente modificado en el tratamiento sin la aplicación de 1-MCP a 23 °C, mostrando diferencias con el resto de los tratamientos. Sin embargo, entre los tratamientos con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 0 °C, 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 0 °C y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 23 °C a los 7 d no se vieron diferencias por las aplicaciones de bajas temperaturas o 1-MCP por separado o combinados (Figura 4.9). A los 14 d se comenzaron a ver diferencias en el contenido de clorofila en el tratamiento con 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 23 °C, disminuyendo fuertemente en el control sin tratar a 23 °C. A los 21 d de almacenamiento, tanto las hojas sin tratar como las tratadas con 1-MCP a 23 °C presentaron pudriciones muy severas, por lo que a partir de ese momento sólo se analizaron las hojas mantenidas a 4 °C.

Por otro lado, a los 21 d se pudieron ver diferencias entre el tratamiento con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 4 °C y el tratamiento con 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 4 °C. Las hojas tratadas con 1-MCP presentaron un mayor contenido de clorofila y estas diferencias se mantuvieron hasta los 28 d de almacenamiento. Por lo tanto, se puede afirmar que el tratamiento con 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 4 °C mostró la menor disminución en el contenido de clorofila a los 28 d de almacenamiento respecto de los valores hallados al momento de cosecha (sólo un 7,2 % de pérdida de clorofila) (Figura 4.9).

Las mismas tendencias fueron halladas al determinar Fv/Fm, produciéndose una disminución altamente significativa de las hojas tratadas con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 23 °C a los 14 días, diferenciándose del resto de los tratamientos (Figura 4.10).

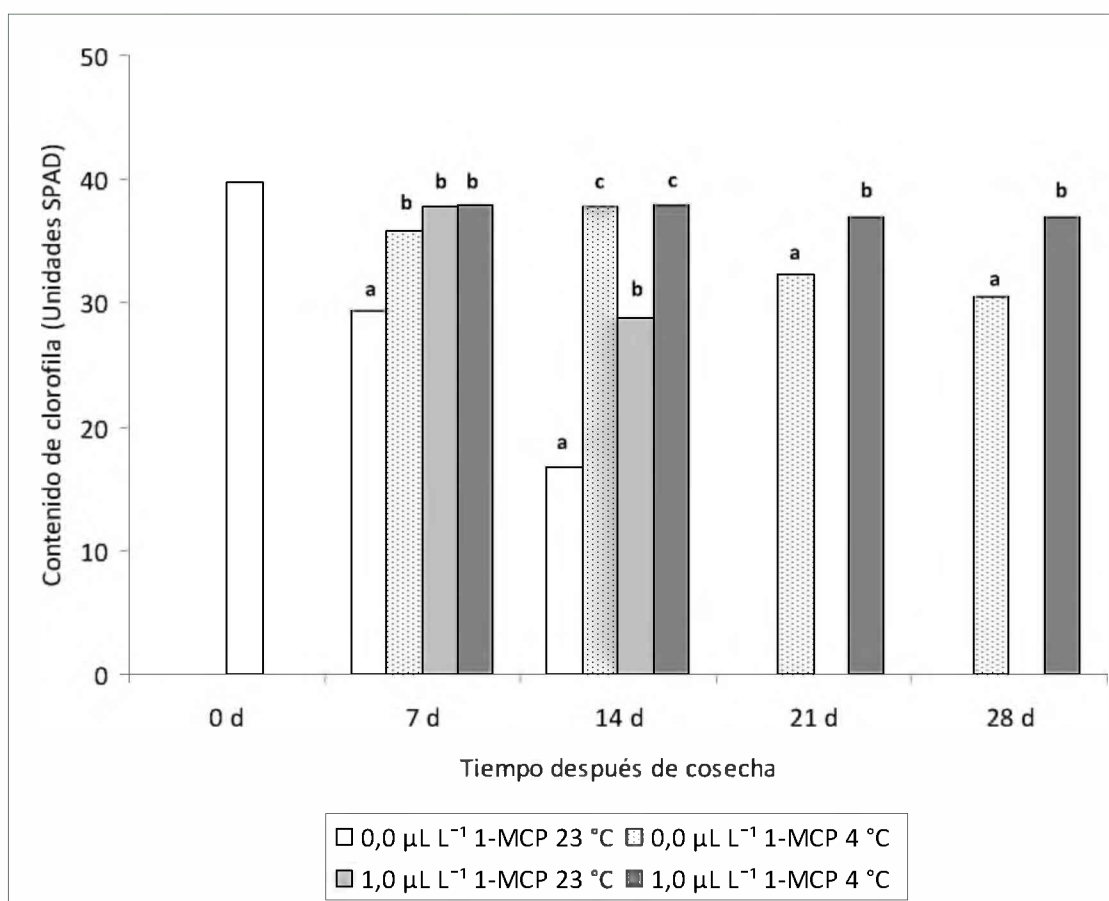


Figura 4.9 Variación del contenido de clorofila en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 µL L⁻¹ y 1,0 µL L⁻¹ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 4 y 23 °C. Letras distintas indican diferencias significativas en un ensayo LSD a un nivel de significancia de $P \leq 0,05$ para cada día de muestreo.

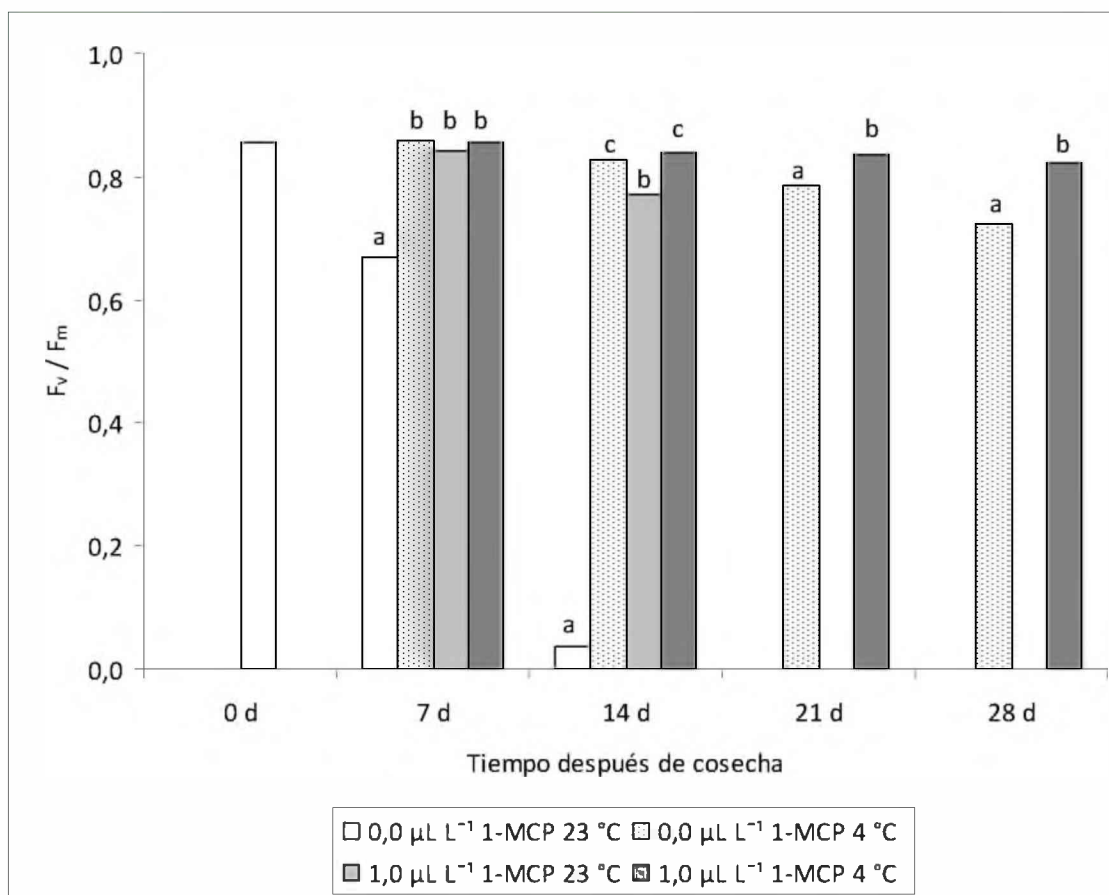


Figura 4.10 Variación del rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (F_v/F_m) en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 4 y 23 °C. Letras distintas indican diferencias significativas en un ensayo LSD a un nivel de significancia de $P \leq 0,05$ para cada día de muestreo.

Por otro lado, al analizar la fuga de solutos, las diferencias entre los diferentes tratamientos se observaron más tempranamente que en los otros dos parámetros de senescencia. A los 7 d de almacenamiento en oscuridad se ve un aumento muy marcado de la conductividad en el tratamiento con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 23 °C, produciéndose un aumento de 1,4 veces, llegando hasta 17,6 veces el valor inicial a los 14 d. Por otro lado los tratamientos con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 4 °C y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 4 °C presentaron los menores valores de conductividad a los 7 d de almacenamiento, siendo inclusive inferiores a los hallados al momento de cosecha, manteniéndose esta tendencia hasta los 14 d inclusive (Figura 4.11). Recién a los 21 d de almacenamiento en la oscuridad se vieron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin 1-MCP a 4 °C, ampliándose dicha diferencia a los 28 d (Figura 4.11).

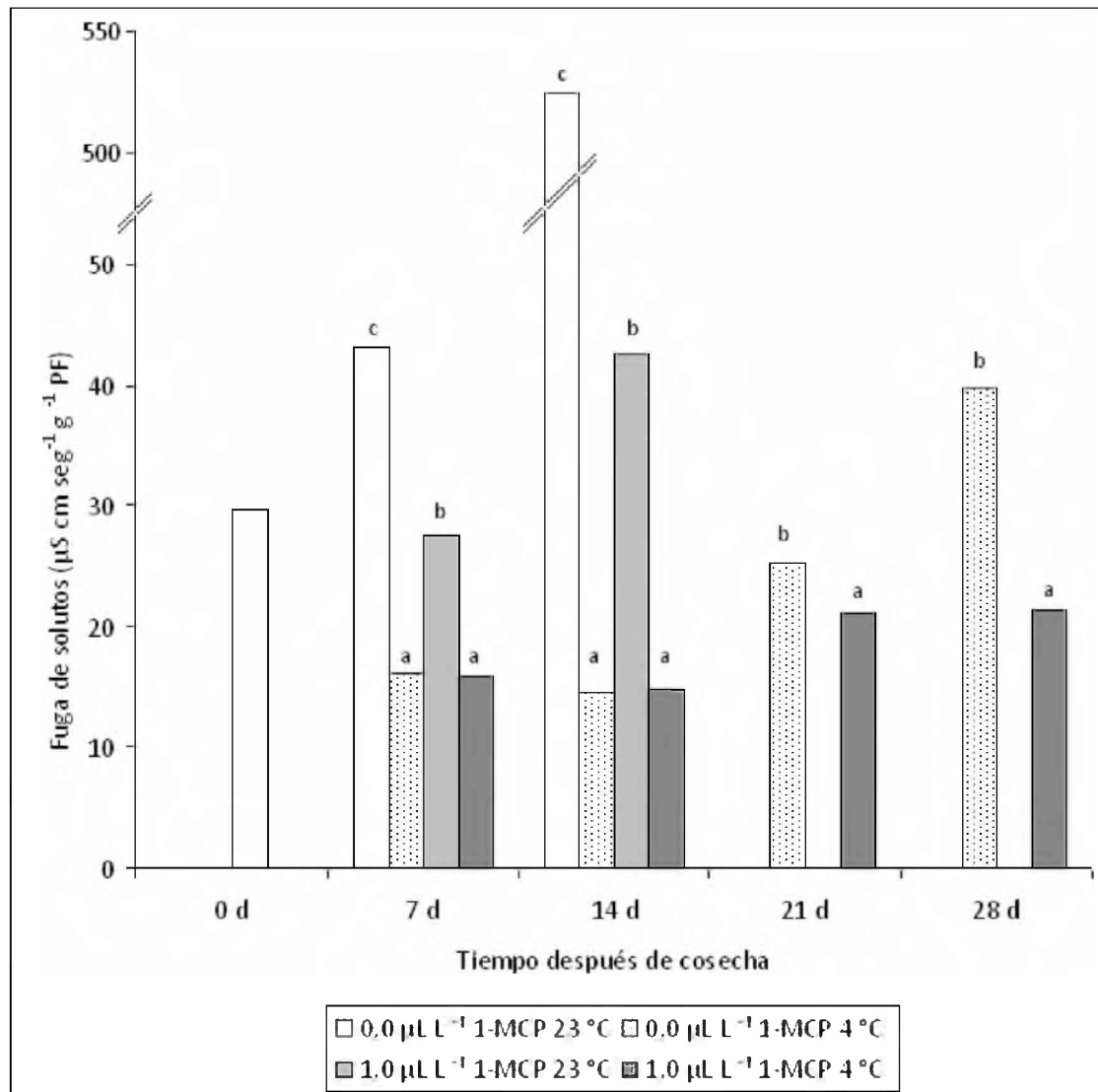


Figura 4.11 Variación de la fuga de solutos en hojas maduras de espinaca tratadas con 0,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP durante el almacenamiento en oscuridad a 4 y 23 °C. Letras distintas indican diferencias significativas en un ensayo LSD a un nivel de significancia de $P \leq 0,05$ para cada día de muestreo.

A partir de estos resultados se puede afirmar que las bajas temperaturas son un factor importante en la postcosecha de hojas de espinaca; pero se ha demostrado en esta tesis que hay un efecto sinérgico producido por el 1-MCP que permite que las mismas puedan mantenerse con altos contenidos de clorofila hasta los 28 d de almacenamiento en la oscuridad (Figura 4.9). Resultados similares han sido encontrados en lechuga (*Lactuca sativa* L.) con tratamientos combinados de 1-MCP y 5 °C (Wills *et al.*, 2002). Además, se puede afirmar que el efecto del etileno endógeno se ve retardado con la temperatura hasta los 14 d, pero este efecto no es duradero en el tiempo, persistiendo la acción del 1-MCP en la última etapa hasta los 28 d de

almacenamiento en oscuridad. Si bien algunas especies disminuyen su sensibilidad a la acción del 1-MCP a bajas temperaturas (Jiang *et al.*, 2002), este efecto no se ha observado en espinaca, mostrando este tratamiento un efectivo retardo de la senescencia foliar. Por lo tanto, la baja temperatura estaría actuando en una primera etapa de la senescencia, mientras que la acción del etileno estaría haciéndose evidente en etapas posteriores durante el almacenamiento en oscuridad.

4.5 Capítulo V

4.5 Capítulo V

4.5.1 Efecto combinado de los pulsos de luz con 1-MCP y refrigeración sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca

Hasta aquí se ha analizado el efecto que tiene el almacenamiento de las hojas de espinaca en oscuridad con tratamientos que incluyeron etefón (Capítulo II) (Gergoff *et al.*, 2010a), 1-MCP y la combinación de 1-MCP y baja temperatura en hojas de espinaca (Capítulo IV) (Gergoff *et al.*, 2010b).

Entre los factores de postcosecha que influyen en el contenido de antioxidantes, y especialmente el AA, Lee & Kader (2000) mencionan a la temperatura, las atmósferas controladas, los cortes, los tratamientos químicos, la radiación ionizante y diferentes métodos de procesamiento como determinantes en la tasa de pérdida de AA. Sin embargo en esta revisión no se ha tenido en cuenta el efecto de la luz, especialmente en lo referente al efecto morfogénico.

La luz es el factor ambiental más importante para las plantas, siendo la maquinaria fotosintética la que responde a los cambios de irradiancia y de la calidad de la luz, que desencadenan procesos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo. Estos cambios en el crecimiento y desarrollo pueden llegar a insumir días (Bukhov, 2004). Sin embargo, la estimulación o represión de los genes producidos por efecto de la luz puede ser muy rápida, llegando en ciertos casos a tardar menos de cinco minutos. Esta expresión temprana de genes puede ser directamente activada por una a más de las cadenas de señales de los fitocromos (Briggs & Olney, 2001).

Paralelamente, las plantas no pueden controlar la absorción de luz en períodos cortos de tiempo, por lo que no pueden evitar la excitación de pigmentos. Durante la evolución, la cadena fotosintética transportadora de electrones ha minimizado la generación de posibles reacciones que produzcan EAO (Foyer & Harbinson, 1994; Foyer & Harbinson, 1999). La intensidad y la duración en la modificación de la homeostasis redox de la célula causada por el incremento de las EAO conduce a cambios en las concentraciones de AA y GSH, que corresponden a los agentes antioxidantes más importantes en vegetales (Noctor & Foyer, 1998).

El contenido y la estabilidad de los antioxidantes en los vegetales tienen una vital

importancia a la hora de caracterizar la calidad nutricional de los alimentos (Davey *et al.*, 2000). Los factores que regulan la síntesis y acumulación de antioxidantes dista mucho de ser conocida (Bartoli *et al.*, 2005b). Es sabido que las señales del ambiente, y en particular la luz, influyen sobre la acumulación de los antioxidantes (Imai *et al.*, 1999; Gatzek *et al.*, 2002). Se ha detectado que el almacenamiento de suspensiones celulares de tabaco en oscuridad ha hecho que la GLDH disminuyera su nivel de transcritos considerablemente al cabo de 6 h (Tabata *et al.*, 2002). Tampoco la cantidad de proteína correspondiente a GLDH da una idea de la capacidad de síntesis de AA (Bartoli *et al.*, 2005b). A partir de ensayos llevados a cabo por Bartoli *et al.* (2006) se ha llegado a probar que la luz y la capacidad respiratoria pueden influenciar la capacidad de síntesis y acumulación, como así también la capacidad de regenerar el AA oxidado. Un trabajo posterior determinó que la calidad de la luz incidente (Relación Rojo/Rojo Lejano) influye fuertemente sobre la síntesis de AA y su estado redox en las hojas, cambios que fueron evidentes al cabo de un fotoperíodo; asimismo el GSH también cambió pero de manera menos marcada (Bartoli *et al.*, 2009).

Trabajos realizados sobre espinaca reafirman lo realizado en otras especies. Se ha demostrado que la concentración de AA se ve aumentada en un 50% cuando la densidad de fotones aumenta hasta un 400 % (Proietti *et al.*, 2004). Las altas concentraciones de AA a intensidades lumínicas por encima de los valores normales pueden ser asociadas al efecto preventivo del AA sobre la formación de EAO a través de la contribución a la disipación segura del exceso de energía absorbida por cloroplastos (Asada, 2000; Eskling, *et al.*, 1997).

Por otro lado, se han realizado trabajos de postcosecha de espinaca aplicando bajas intensidades lumínicas en forma continua (Toledo *et al.*, 2003; Lester *et al.*, 2010). Sin embargo ninguno de estos trabajos ensayó la dosificación de la luz en pulsos de corta duración y baja intensidad, con la consecuente disminución del gasto energético y cómo pueden influir en la acumulación y síntesis del AA y el GSH.

4.5.1.1 Punto de compensación lumínico de hojas maduras de espinaca

Es sabido que la síntesis de AA tiene como primer precursor a la D-glucosa, la cual

proviene de la fotosíntesis (Loewus *et al.*, 1956; Loewus, 1963), siendo la vía de síntesis más importante la que tiene como intermediarios a la GDP-D-manosa culminando en la GLDH (Smirnoff *et al.*, 2001), que es convertida en AA por la GLDH (Ôba *et al.*, 1994). A los fines de evitar que los tratamientos con pulsos de luz provoquen la acumulación de azúcares provenientes de la fotosíntesis y que sean dirigidos para la síntesis *de novo* de AA, se decidió determinar el punto de compensación lumínico. A partir de la metodología utilizada por Maydup *et al.* (2010) se determinó el punto de compensación lumínico de hojas maduras de espinaca; es decir la intensidad lumínica a la cual la respiración se equipara con la fotosíntesis dando una producción neta de $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ igual a cero (Salisbury & Ross, 1992b) (Figura 5.1). Se determinó que la intensidad lumínica en el punto de compensación es de $31,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fotones, por lo que se tomó el valor de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para llevar a cabo los ensayos que en este capítulo se discuten.

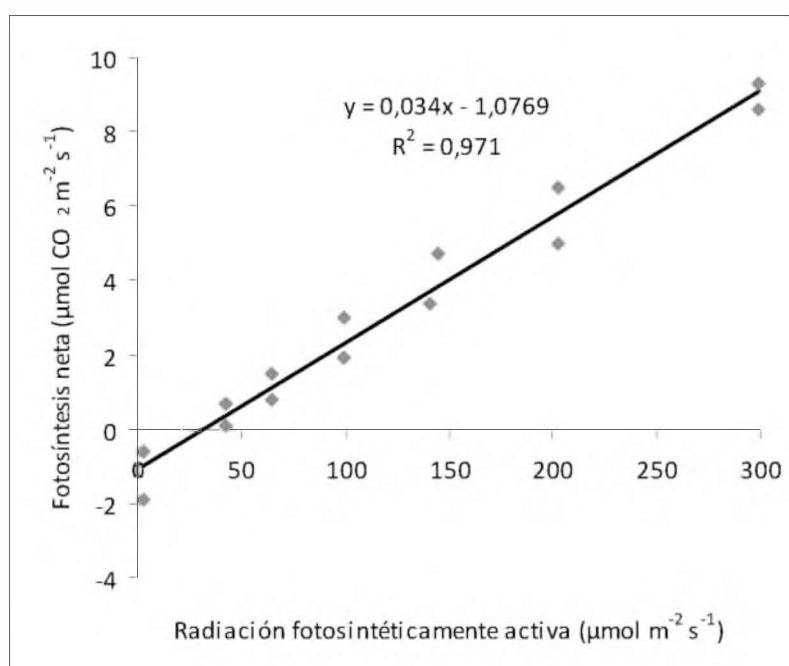


Figura 5.1 Determinación del punto de compensación lumínico de hojas maduras de espinaca

4.5.1.2 Efecto de pulsos cortos de luz sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca

En este apartado se mostrarán los efectos que pueden tener los pulsos cortos de

luz sobre hojas maduras de espinaca durante su vida postcosecha almacenadas en oscuridad. Como primera aproximación se evaluaron aplicaciones de pulsos de 15 min de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ cada 2 y 6 h, lo que equivale a tres y una hora de luz aplicada por día, respectivamente.

Se evaluaron el contenido de clorofila, F_v/F_m y la fuga de solutos como parámetros de senescencia; y la actividad de catalasa como parámetro de estrés oxidativo.

Como se puede observar en la Figura 5.2, el contenido de clorofila se mantiene por encima del control en los tratamientos de pulsos de 15 min cada 2 y 6 h. Esta misma tendencia se mantuvo inclusive cuando las hojas fueron almacenadas en oscuridad a 4 °C por el término de una semana adicional.

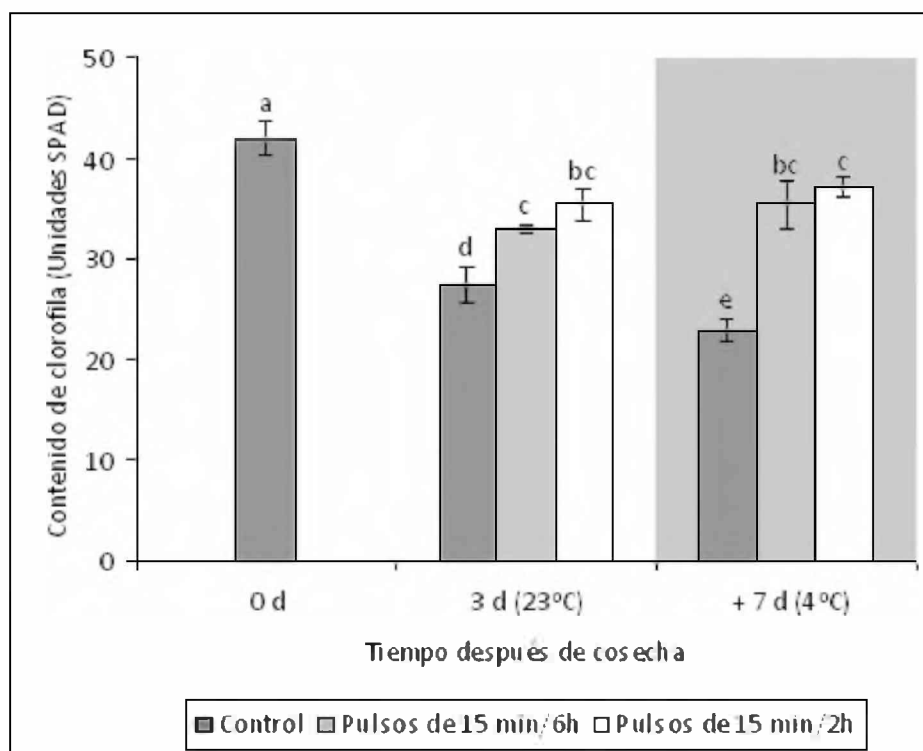


Figura 5.2 Contenido de clorofila en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Las hojas no mostrando signos de marchitamiento ni daños por la aplicación de pulsos de luz (Figura 5.3). Tampoco se han encontrado diferencias en la relación PS/PF, por lo que no se vio afectado el contenido de agua (datos no mostrados).

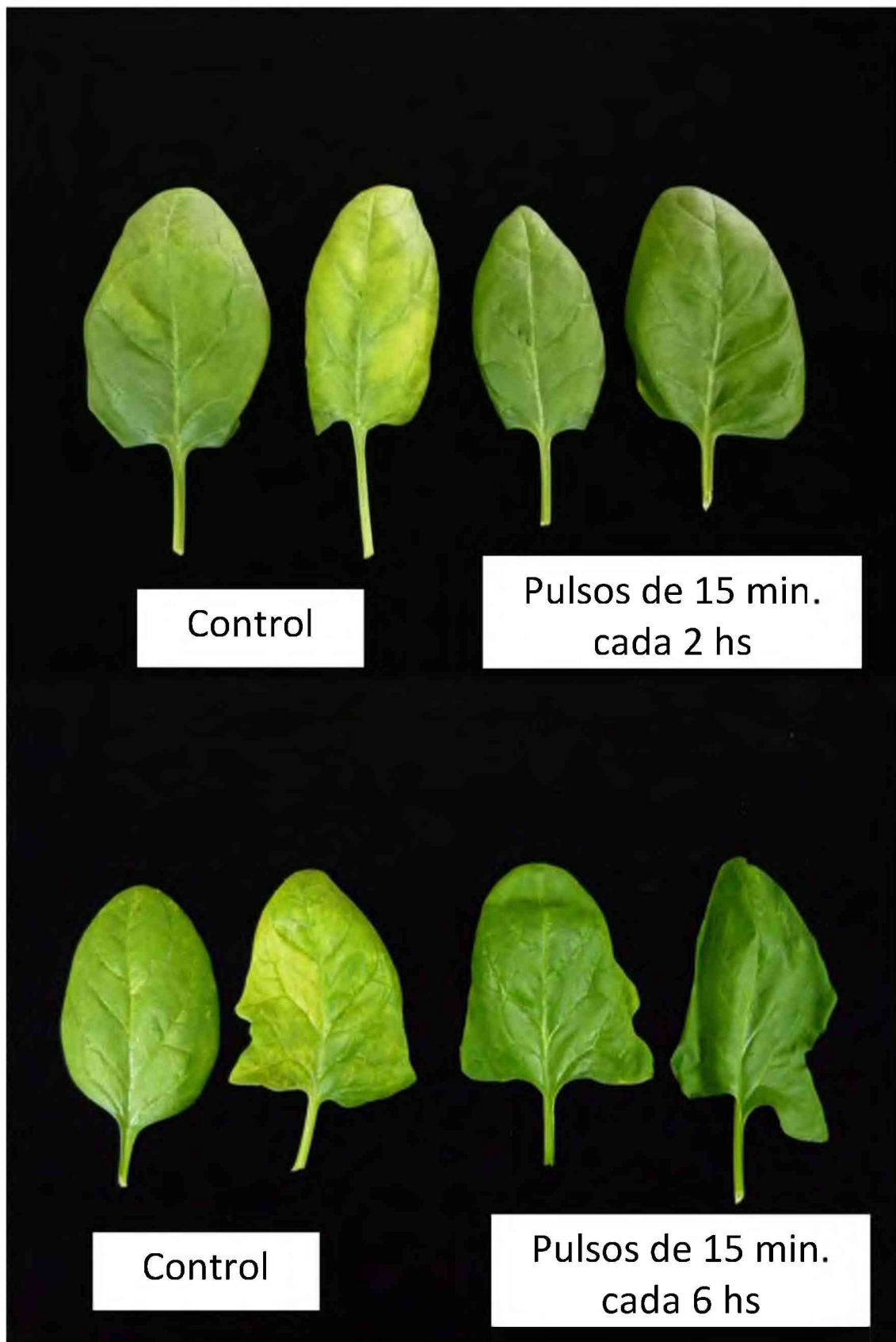


Figura 5.3 Hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C.

La misma tendencia se puede observar en F_v/F_m (Figura 5.4), en donde los tratamientos con pulsos de 15 min cada 2 y 6 h no se pudieron diferenciar estadísticamente, pero siempre manteniéndose por encima del control mantenido en oscuridad.

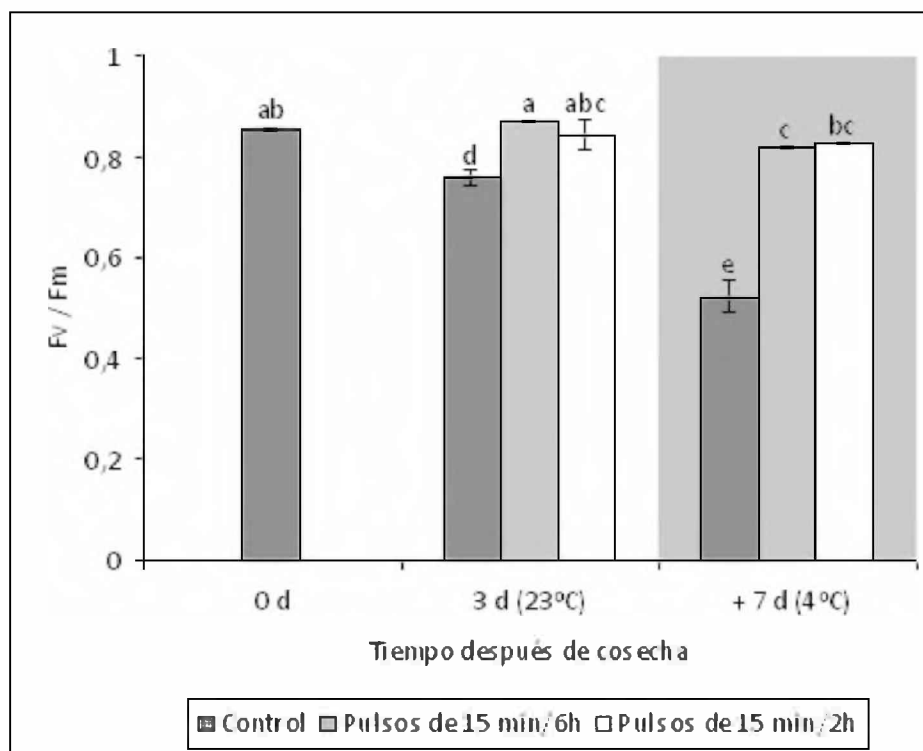


Figura 5.4 Rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (F_v/F_m) en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Sin embargo, las diferencias entre los tres tratamientos se pueden apreciar en la fuga de solutos, siendo este un buen indicador de los efectos de la luz. A los 3 d, las hojas con pulsos de luz de 15 min cada 2 h mostraron valores similares a los hallados al momento de la cosecha, mientras que el control aumentó significativamente al igual que el tratamiento de pulsos de 15 min cada 6 h. A los 7 d de haber almacenado las hojas en oscuridad, los tratamientos con pulsos de luz de 15 min cada 2 y 6 h siguieron diferenciándose del control, cuya conductividad aumentó más de dos veces.

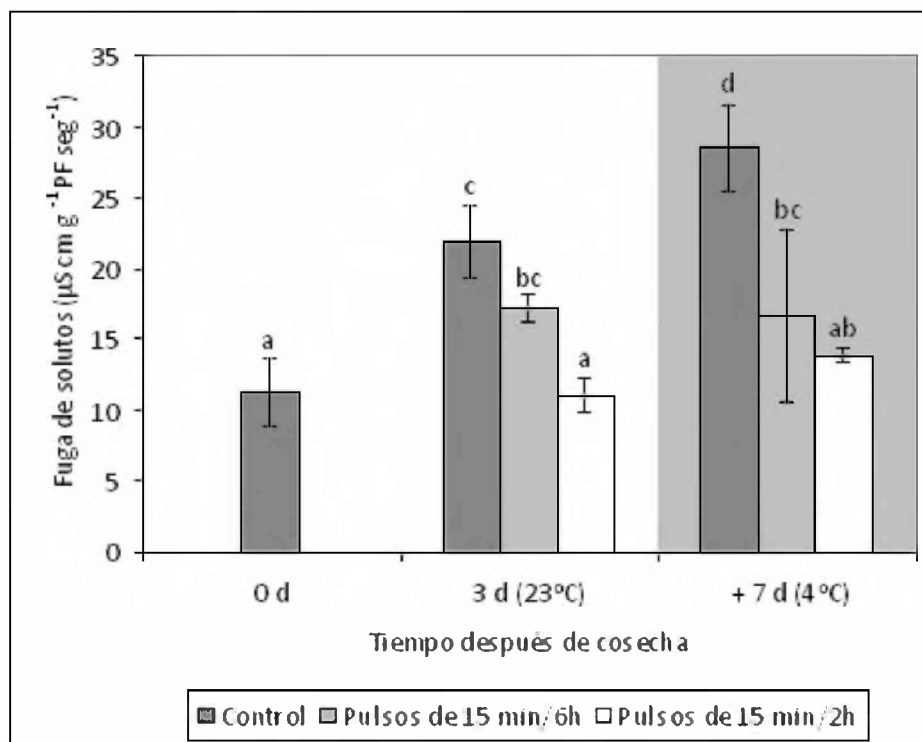


Figura 5.5 Fuga de solutos en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 minutos con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Complementariamente se determinó la actividad de catalasa; se puede observar que la actividad se ve disminuida por la aplicación de pulsos de luz a los 3 d de almacenamiento en la oscuridad, mientras que el control aumentó su actividad respecto del valor inicial al momento de cosecha. A los 7 d de almacenadas las hojas en oscuridad a 4 °C, el control y el tratamiento con pulsos de 15 min cada 6 h presentan valores similares, manteniéndose el tratamiento con pulsos de 15 min cada 2 h en valores similares a los hallados al inicio del experimento (Figura 5.6). En ensayos realizados sobre centeno (*Secale cereale* L.), Hertwig *et al.* (1992) encontraron que la actividad de catalasa se ve fuertemente disminuida por la luz, tanto a bajas irradiancias ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), como a altas irradiancias ($520 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), por lo que se llegó a la conclusión de que esta enzima es fotosensible. Sin embargo, a pesar de esta degradación, este mismo autor vio que la síntesis *de novo* se vio aumentada cuando las hojas de centeno eran expuestas a altas irradiancias y que esta nueva síntesis fue baja en plena oscuridad. A partir de los resultados hallados en la presente tesis, se puede afirmar que la actividad de catalasa se ve fuertemente disminuida por efecto de la luz, inclusive en irradiancias tan bajas como $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y durante el almacenamiento en

oscuridad su actividad se ve incrementada. Estos datos a su vez confirman con los hallados en el Capítulo II y por Hodges & Forney (2000), donde el almacenamiento de hojas de espinaca en oscuridad produce un aumento en la actividad de catalasa.

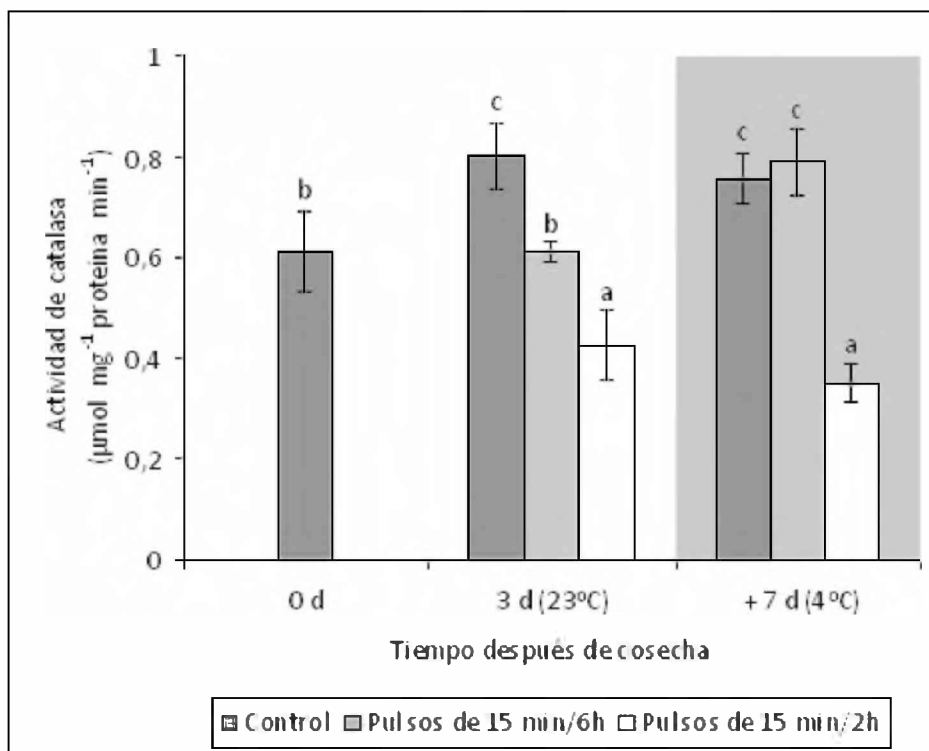


Figura 5.6 Actividad de catalasa en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

4.5.1.3 Efecto de pulsos cortos de luz sobre el contenido de antioxidantes en hojas maduras de espinaca

Dentro de los parámetros de calidad nutricional, se evaluaron los contenidos de AA y GSH, junto con sus respectivos estados redox, además de los contenidos de dos antioxidantes de medios lipofílicos, γ - y α -tocoferol. Como se puede observar en la Figura 5.7, el contenido de AA se mantiene en valores similares a los hallados al momento de la cosecha a los 3 d en los tratamientos con pulsos de 15 min cada 2 y 6 h; sin embargo el control disminuye su contenido a la mitad. Al almacenar las hojas 7 d más en oscuridad a 4 °C, el tratamiento de pulsos de 15 min cada 6 h no fue efectivo en mantener mayores valores de AA que las hojas no tratadas, pero sí el tratamiento con

pulsos más frecuentes. Al analizar el estado redox del AA, solamente el tratamiento con pulsos de 15 min cada 2 h mostró valores significativamente menores a los hallados en el control a los 3 d, manteniendo esta diferencia al almacenar las hojas a 4 °C por una semana adicional (Figura 5.8). A partir de estos resultados, se puede llegar a afirmar que los pulsos más frecuentes son más efectivos, y tienen un efecto que perdura en el tiempo, por más que sean interrumpidos. Toledo *et al.* (2003), trabajando con luz continua de baja irradiancia ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) llegó a la conclusión que la tasa de degradación de AA se ve disminuida con la aplicación de luz, llegando a una pérdida del 32 % al cabo de 24 d a 4 °C, mientras que el control en oscuridad perdió casi el 54 %. Sin embargo este autor no encontró diferencias significativas en el estado redox del AA. Al separar las hojas de espinaca de la planta y almacenarlas en oscuridad, la vía fotosintética que aporta carbohidratos para la síntesis de AA es anulada y como consecuencia produciría una disminución en el contenido de este antioxidante (Gergoff *et al.*, 2010a). Es sabido que una de las vías más importantes en la síntesis de AA se produce a partir de las hexosas (Smirnoff & Pallanca, 1996; Wheeler *et al.*, 1998), y que el aumento de la disponibilidad de azúcares, especialmente glucosa, puede contribuir a aumentar la síntesis de AA. Se ha observado que existe una relación entre la capacidad de síntesis de AA y la edad de la hoja cuando se le aplica luz. Hojas jóvenes a altas irradiancias producen mayores cantidades de AA (Smirnoff & Pallanca, 1996).

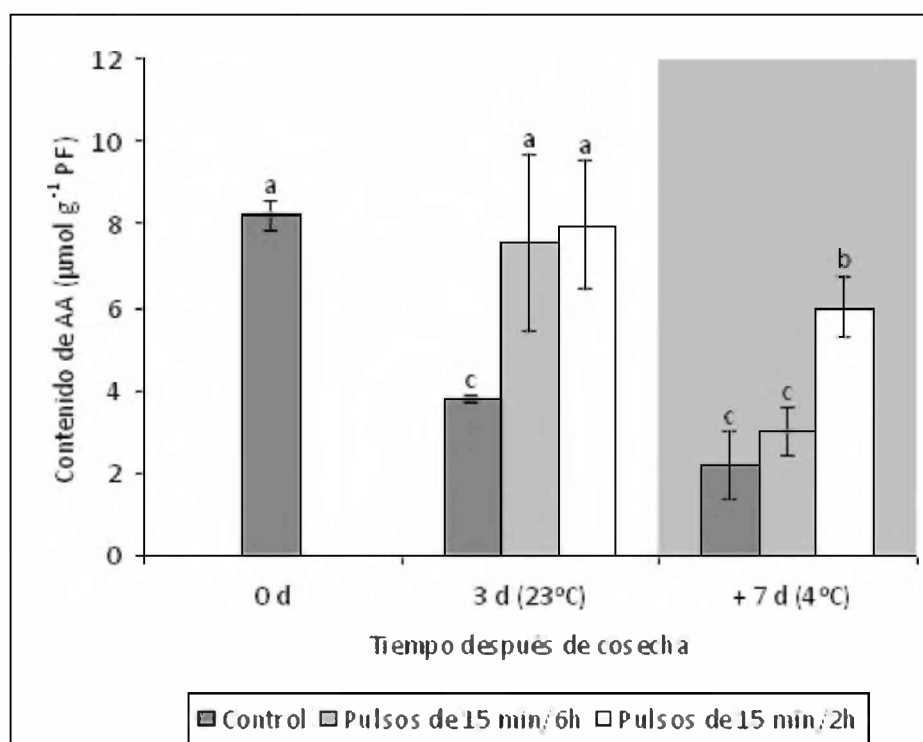


Figura 5.7 Contenido de AA en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

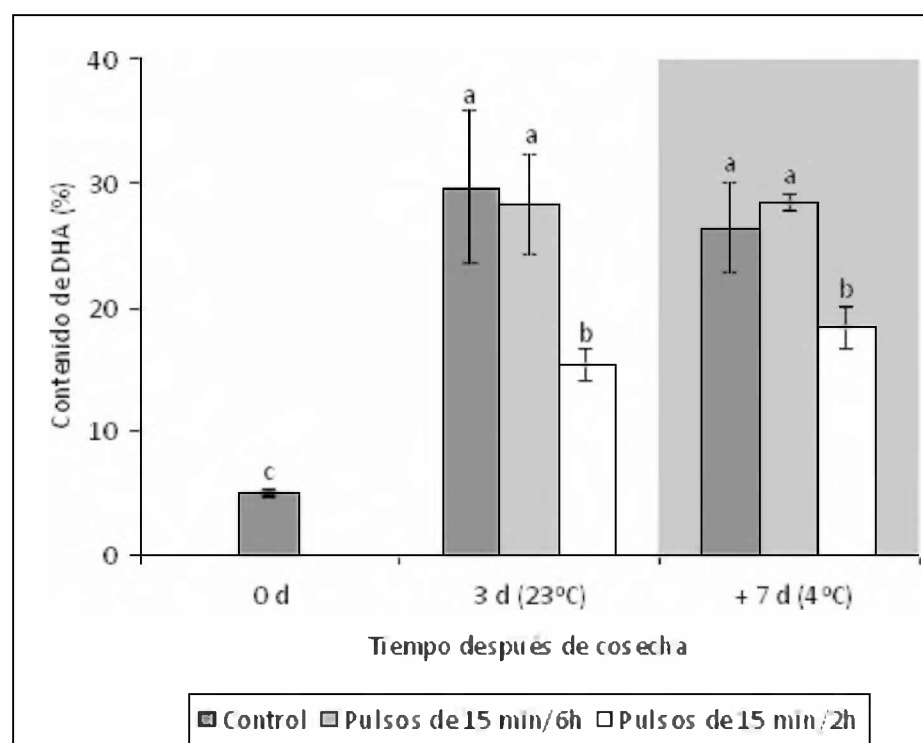


Figura 5.8 Contenido de DHA (%) en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Con respecto al GSH, a los 3 d de iniciado el tratamiento se ve un aumento de su contenido cuando se aplican pulsos de luz. Los pulsos aplicados de 15 min cada 2 h presentaron valores por encima del resto de los tratamientos a los 7 d de haber almacenado las hojas en oscuridad a 4 °C (Figura 5.9). Sin embargo no se han detectado diferencias significativas en el estado redox del GSH en ninguno de los tratamientos (Figura 5.10). Law *et al.* (1983) trabajando con espinaca no observó diferencias en el estado redox de AA ni de GSH sobre hojas aclimatadas a oscuridad o bajo luz continua, pero sí detectó cambios cuando se aplicó H₂O₂, simulando el desencadenamiento de EAO por estrés.

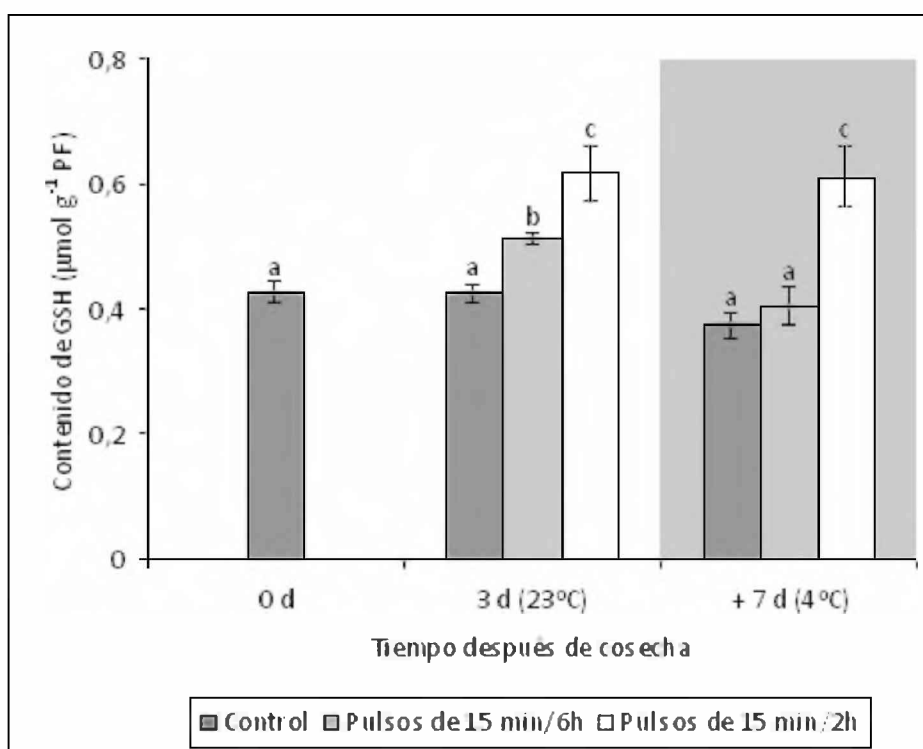


Figura 5.9. Contenido de GSH en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

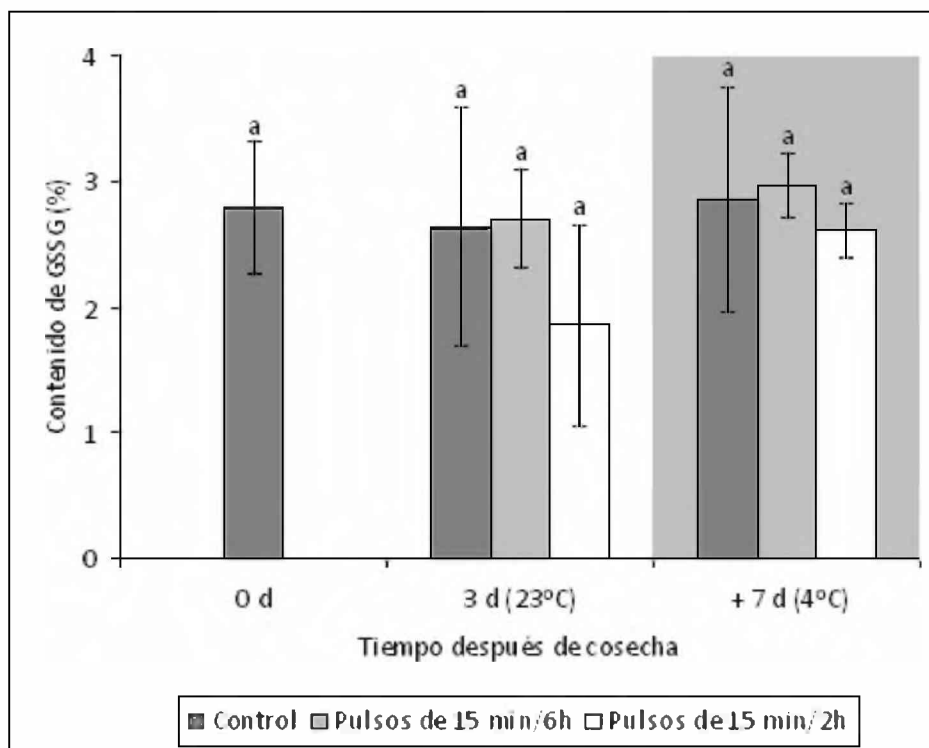


Figura 5.10 Contenido de GSSG en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Estos resultados concuerdan con los contenidos de AA en hojas tratadas con pulsos de luz de 15 min cada 2 h (Figura 5.7). El GSH funciona como dador de electrones para reducir el AA por medio de la enzima DHAR (Smirnov, 2000), lo que haría que el contenido de AA se encuentre en niveles altos (Figura 5.7) y su estado oxidado disminuya (Figura 5.8).

Los contenidos de antioxidantes coinciden con los hallados con las actividades de MDHAR y DHAR, junto con la capacidad de síntesis *in vivo* de AA. Los datos de la Tabla 5.1, muestran un incremento de la capacidad de síntesis de AA en los tratamientos con pulsos de luz de 15 min cada 2 y 6 h. Por otro lado, la actividad de las enzimas que recuperan las formas oxidadas del AA se ve incrementada por la acción de los pulsos de luz, concordando con los datos hallados en el estado redox del AA (Figura 5.8). Estos datos hallados coinciden con los de Toledo *et al.* (2003), donde la vía de síntesis y la vía de recuperación de las formas oxidadas se ve activada por la exposición continua a luz. Por otro lado, Schöner & Krause (1990) encontraron que tratamientos con bajas temperaturas (1 °C) en combinación con luz continua ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$) protegieron

al sistema fotosintético de hojas de espinaca de las EAO, mantenido un mayor contenido de AA y una mayor actividad de SOD, APX y MDHAR en cloroplastos.

Tratamientos	0 d		3 d (23°C)		+ 7d (4°C)		
	Control	Control	Pulsos de 15 min/6h	Pulsos de 15 min/2h	Control	Pulsos de 15 min/ 6h	Pulsos de 15 min/2h
Capacidad de síntesis de AA ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$)	8,04 c	3,17 a	4,65 b	7,06 c	3,97 ab	7,27 c	7,66 c
MDHAR ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$)	2,92 bc	1,64 a	2,05 a	3,22 c	1,91 a	2,28 ab	3,06 bc
DHAR ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$)	1,26 bc	0,62 a	1,80 cd	2,21 d	0,48 a	1,21 b	1,18 b

Tabla 5.1 Capacidad de síntesis de AA, actividad de MDHAR y DHAR en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Por otro lado, el contenido de α -tocoferol se ve incrementado a los 3 d en los tres tratamientos, observándose un incremento mayor en el tratamiento con pulsos de 15 min cada 6 h (Figura 5.11). Posteriormente, al almacenar las hojas en oscuridad y frío por 7 d adicionales, el contenido de α -tocoferol baja nuevamente en el tratamiento de 15 min cada 6 h, manteniendo el contenido los tratamientos con oscuridad y pulsos de 15 min cada 2 h (Figura 5.11). Con respecto al contenido de γ -tocoferol, se ven tendencias similares a las halladas con α -tocoferol (Figura 5.12).

Se ha encontrado en varias especies, que cuando hojas o plantas enteras son transferidas a la oscuridad, aumentan el contenido de α -tocoferol; mientras que cuando son transferidas a la luz, se ve el efecto inverso (Booth, 1964). Por otro lado, se han visto aumentos en el contenido de α -tocoferol en plantas sometidas a diversos estreses (Munné-Bosch, 2005), entre ellos el ocasionado por altas irradiancias (Yamauchi & Matsushita, 1979). Contrariamente cuando las plantas son mantenidas a $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el contenido de α -tocoferol se mantiene constante (DeLong & Steffen, 1997). Sin embargo, a partir de los resultados presentados, tanto la oscuridad, como pulsos discretos de luz de baja irradiancia produjeron un efecto similar, aumentando la síntesis de α -tocoferol.

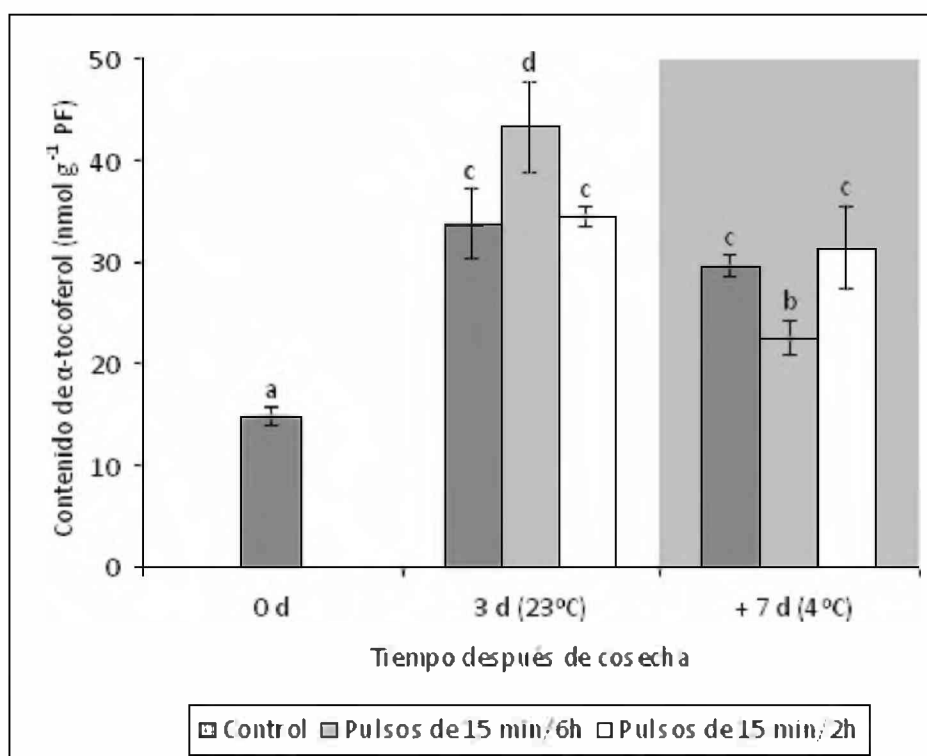


Figura 5.11 Contenido de α -tocoferol en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

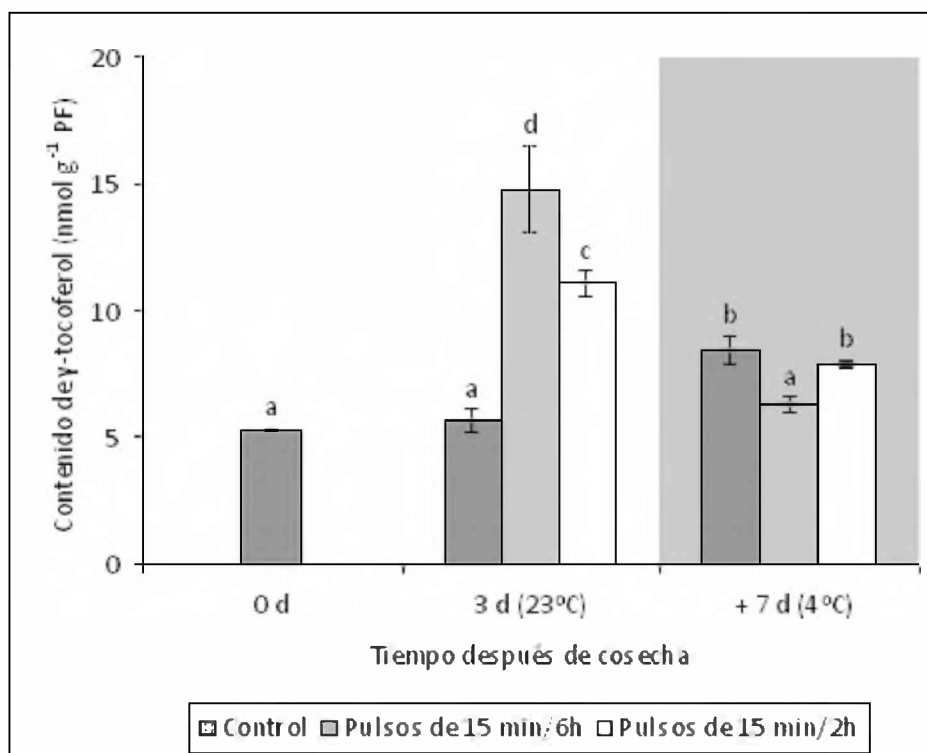


Figura 5.12 Contenido de γ -tocoferol en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 y 6 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Durante la senescencia, los tocoferoles muestran un patrón característico, en donde en etapas tempranas, se produce un aumento considerado, para luego descender nuevamente. En la primera fase el aumento del contenido de tocoferoles ayuda al control de las EAO; pero a medida que avanza el proceso de senescencia, la producción de EAO supera a la capacidad antioxidante de los tocoferoles, haciendo que disminuyan (Munné-Bosch, 2005). Este efecto se puede observar en las Figuras 5.11 y 5.12, en donde a los 3 d se produce un aumento y al cabo de 7 d bajo refrigeración vuelven a disminuir.

Estos resultados sugieren que la aplicación de luz no es necesaria que se realice en forma continua para producir una mejora en la vida postcosecha de espinacas, puesto que pulsos de luz de 15 min cada 2 h producen efectos similares y éstos se mantienen a pesar de que las hojas sean almacenadas luego en oscuridad continua durante otros 7 d a 4 °C. El tratamiento de pulsos cada 2 h fue más efectivo que cada 6 h, por lo tanto, la frecuencia parece ser un factor importante para mantener el contenido de antioxidantes en niveles altos, como así también para mantener la capacidad de síntesis y recuperación de las formas oxidadas.

4.5.2.1 Efecto de los pulsos de luz localizados sobre la senescencia de hojas maduras de espinaca

A partir de los resultados encontrados en el apartado anterior, se decidió utilizar pulsos de luz localizada, para determinar si el efecto de la luz es localizado o sistémico. Para ello se aplicaron pulsos de luz de 15 min cada 6 h por el término de 3 d consecutivos a un hemilimbo. El otro hemilimbo fue cubierto por una lámina de aluminio para evitar que la luz penetre en la hoja. Un trabajo llevado a cabo por Tabata *et al.* (2002) llegó a determinar que las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en el lado iluminado tenían un mayor contenido de AA y el contenido de GLDH fue mayor en las mitades expuestas a la luz, respecto de las que se mantuvieron en oscuridad. También determinó que los hemilimbos iluminados reactivan la actividad de GLDH, produciendo mayores contenidos de AA.

Dentro de los parámetros de senescencia determinados se midió el contenido de clorofila y la fuga de solutos; y complementariamente la actividad de catalasa como un

indicador del estrés oxidativo.

Respecto del contenido de clorofila, se determinó por partes de la hoja, dividiendo cada hemilimbo en parte apical y parte basal. Como se puede observar en la Figura 5.13, los hemilimbos tratados con pulsos de luz mostraron mayores contenidos de clorofila respecto del lado oscurecido a los 3 d de aplicar pulsos de luz. Estas diferencias son menores cuando las hojas son llevadas a la oscuridad, siendo los tratamientos con pulsos de luz apical y basal similares a los hallados en la parte basal del hemilimbo oscurecido. Es sabido que la senescencia es una removilización de nutrientes que son translocados desde las hojas más adultas hacia los lugares de mayor actividad (Gan & Amasino, 1997). La senescencia foliar posee un patrón característico respecto de la secuencia de degradación de clorofila. La degradación se produce desde la parte apical de las hojas hacia las nervaduras y la base (Gan & Amasino, 1997). Este mismo efecto se ve en la Figura 5.13, donde las partes basales de hojas mantenidas en oscuridad presentan mayores niveles de clorofila respecto de las apicales a los tres días de tratamiento. Estas diferencias no se ven cuando las hojas son iluminadas con pulsos de baja irradiancia tanto a los tres días como hacia el final de los ensayos (Figura 5.13).

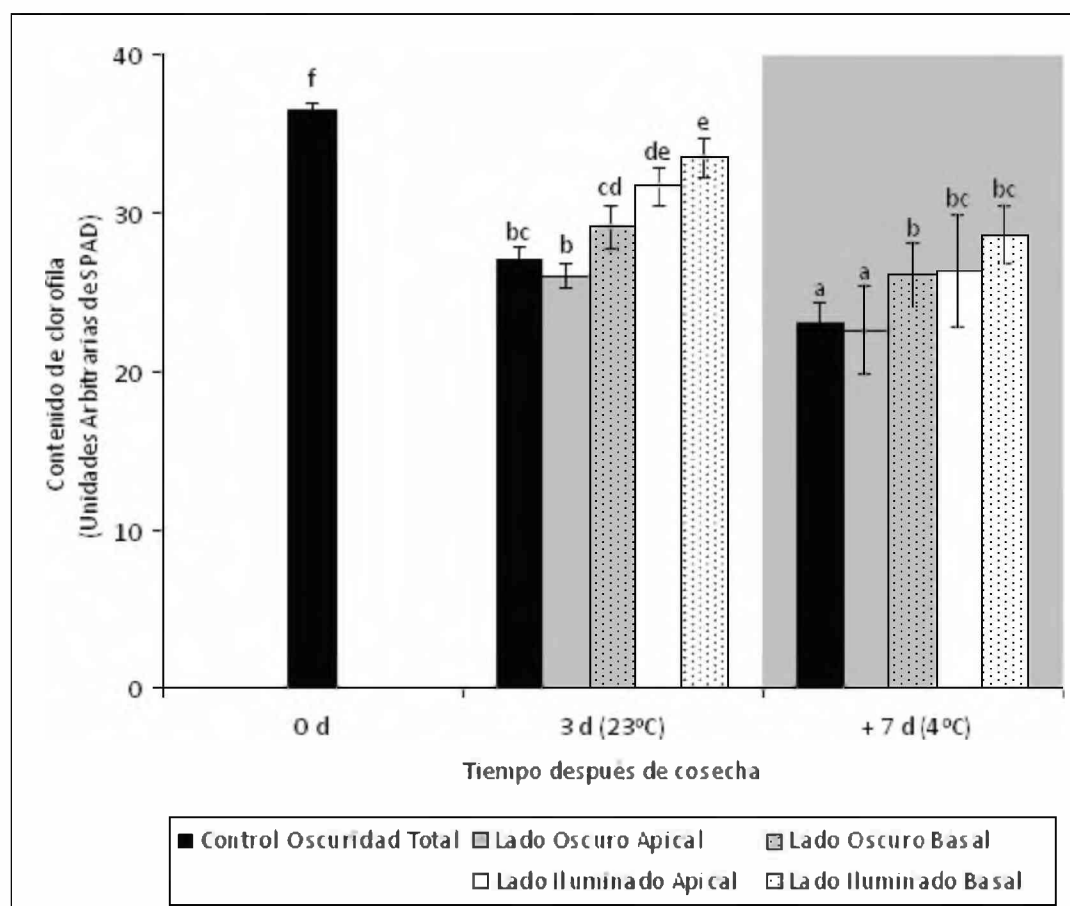


Figura 5.13 Contenido de Clorofila en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 6 h en forma localizada por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0.05$)

Ahora, al analizar la fuga de solutos los datos se presentaron como un promedio de las partes basal y apical para cada hemilimbo (Figura 5.14). Se puede observar que el hemilimbo iluminado disminuyó fuertemente respecto del control, tanto a los 3 d como a los 7 d posteriores completamente en oscuridad a 4 °C. El hemilimbo no iluminado mostró valores intermedios, siempre manteniéndose por debajo del control mantenido en oscuridad total.

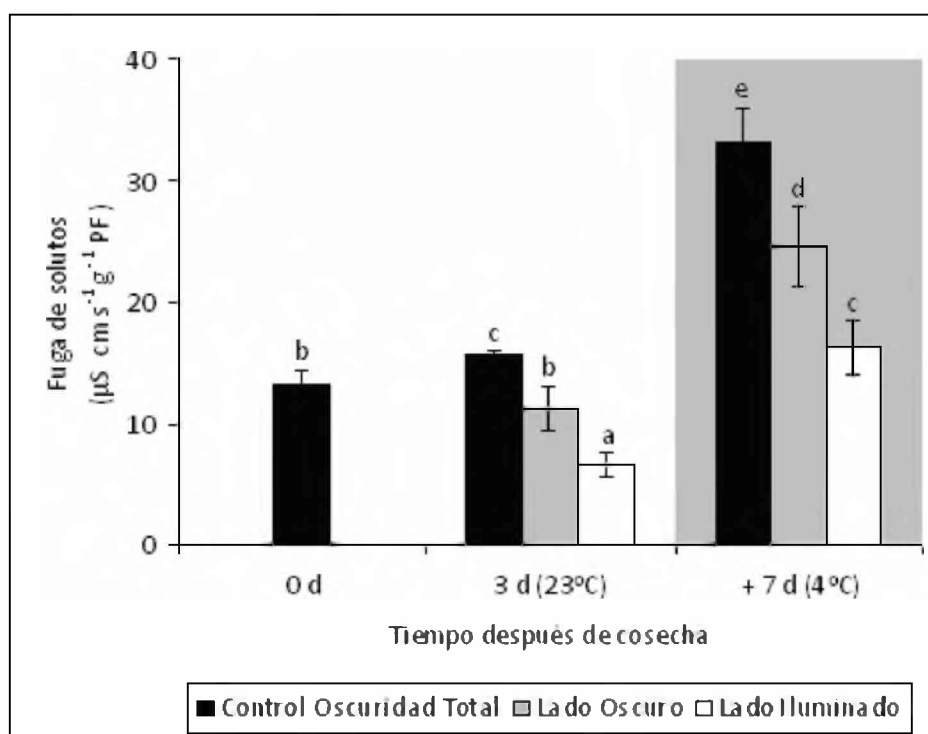


Figura 5.14 Fuga de solutos en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 h en forma localizada por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Con respecto a la actividad de catalasa (Figura 5.15), se observa la misma tendencia que la medida para la fuga de solutos, aumentando considerablemente cuando las hojas son mantenidas en oscuridad total, disminuyendo fuertemente cuando se aplican pulsos y manteniéndose en valores intermedios los hemilimbos tapados. Como ya se ha mencionado anteriormente, la catalasa ha demostrado ser fotosensible, bajando su contenido (Hertwig *et al.*, 1992) y su actividad (Figura 5.15) en hojas de espinaca.

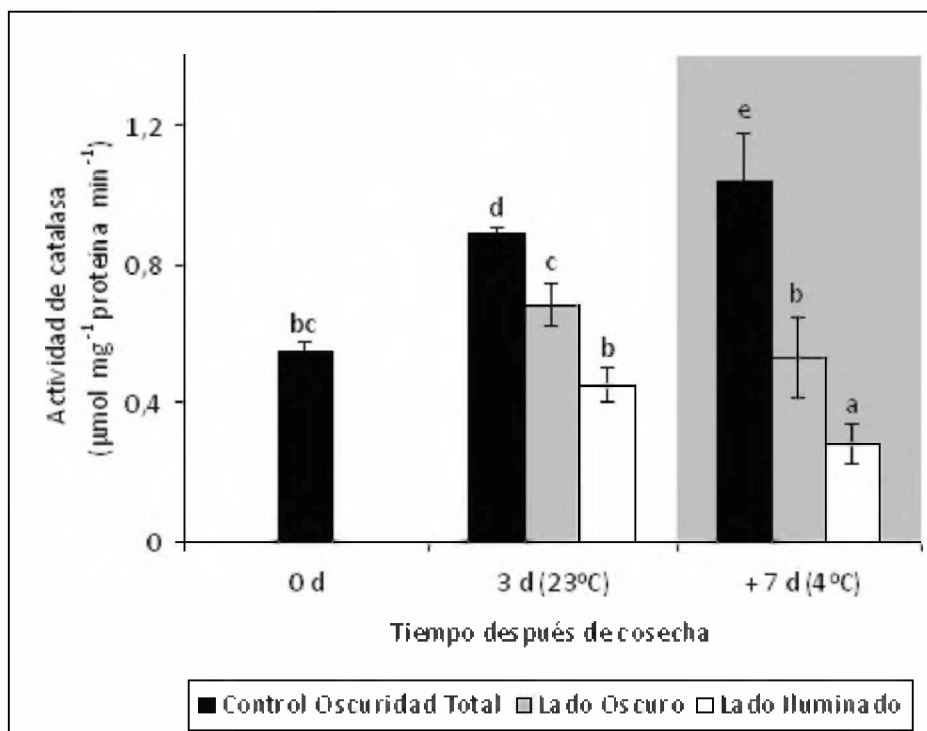


Figura 5.15 Actividad de Catalasa en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 h en forma localizada por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

4.5.2.2 Efecto de los pulsos de luz localizados sobre el contenido de antioxidantes solubles en hojas maduras de espinaca

Como es sabido, el AA es necesario para eliminar las EAO producidas durante la fotosíntesis. Se ha mencionado que la luz estimula la síntesis de AA (Grace & Logan, 1996; Bartoli *et al.*, 2006) y el AA ayuda en la homeostasis del sistema antioxidante de la célula (Veljovic-Jovanovic *et al.* 2001). A partir de los resultados hallados en la Figura 5.16, se puede ver la influencia que tienen los pulsos de luz localizados sobre la acumulación de antioxidantes en hojas de espinaca. A los 3 d de haberse aplicado los pulsos, el hemilimbo iluminado presenta valores mayores de AA respecto del control, pero menores a los hallados al momento de la cosecha. El hemilimbo tapado presenta valores intermedios, pero siempre por encima del control en oscuridad total. Sin embargo, estas diferencias no se mantienen a los 7 d de haber almacenado las hojas en oscuridad a 4 °C, estando el hemilimbo iluminado por encima de los otros dos tratamientos.

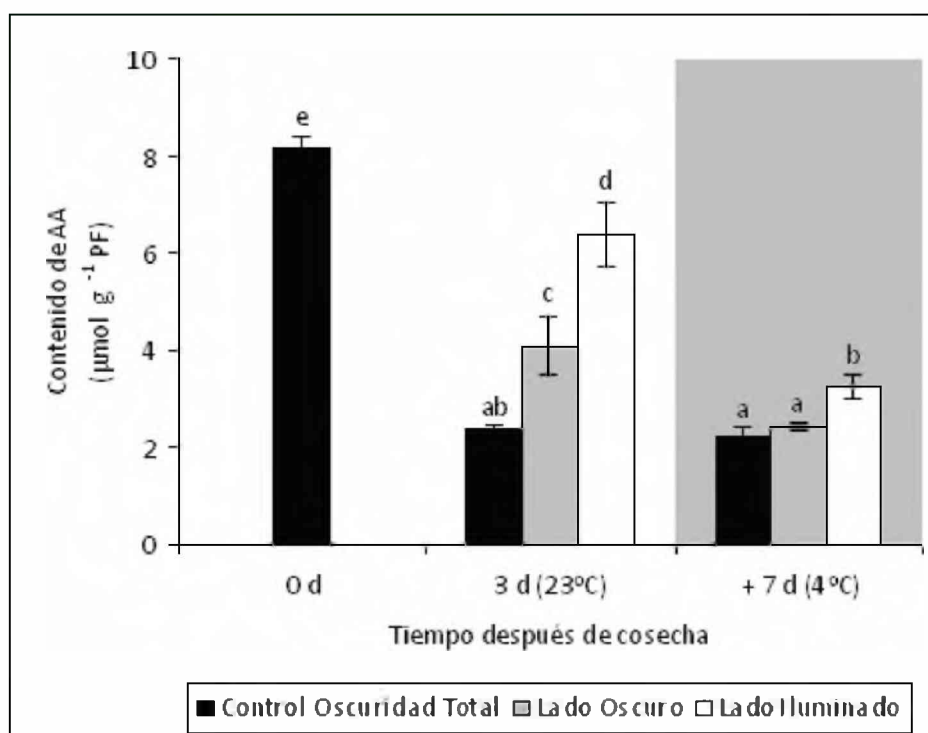


Figura 5.16 Contenido de AA en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 h en forma localizada por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Respecto del estado redox del AA (Figura 5.17), se puede ver que el control en oscuridad total presenta siempre valores mayores respecto del resto de los tratamientos; sin embargo a los 7 d de haber almacenado las hojas en oscuridad a 4 °C, el hemilimbo oscurecido se equipara con los valores hallados en el control de oscuridad total.

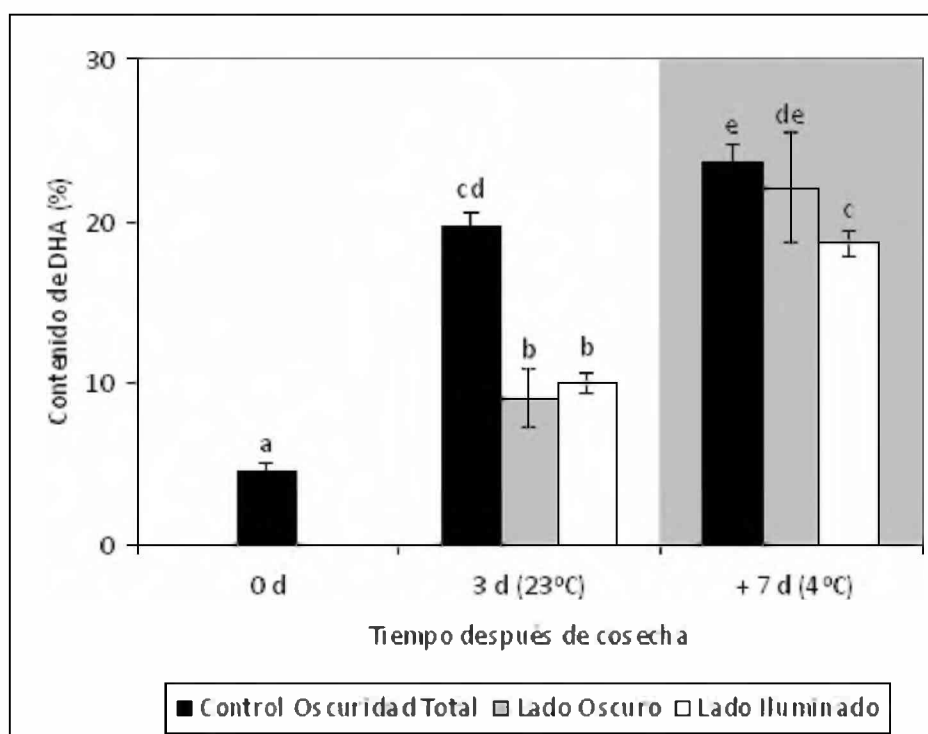


Figura 5.17 Contenido de DHA (%) en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 h en forma localizada por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Cuando se analiza el contenido de GSH (Figura 5.18), el efecto es menos marcado, estando el hemilimbo oscurecido en valores similares a los del control. Solamente al final del ensayo cuando las hojas son almacenadas en oscuridad a 4 °C los hemilimbos oscurecidos se mantienen en valores por encima del control en oscuridad total. Los hemilimbos tratados con pulsos de luz, siempre mantuvieron valores por encima del control. El estado redox del GSH, no se modificó a lo largo de los experimentos en ninguno de los tratamientos (Figura 5.19).

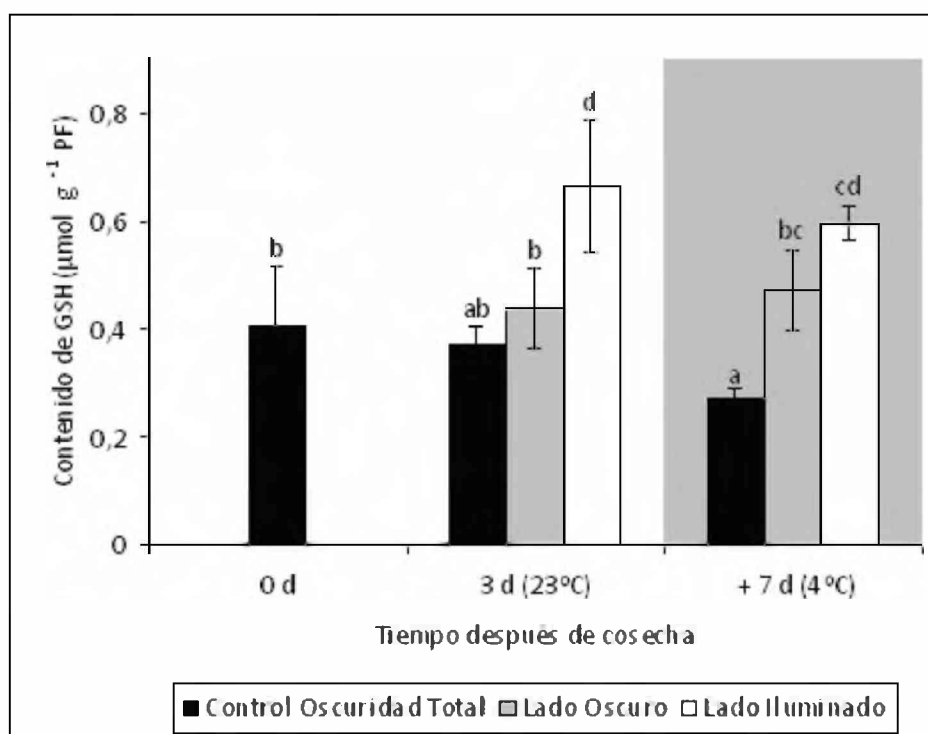


Figura 5.18 Contenido de GSH en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 h en forma localizada por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

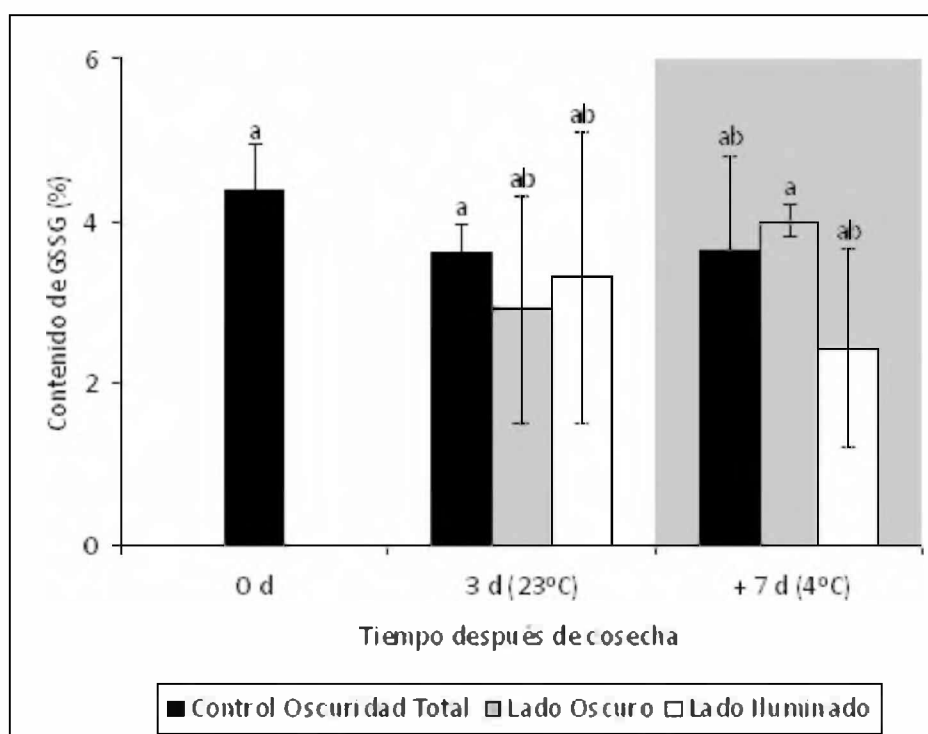


Figura 5.19 Contenido de GSSG (%) en hojas maduras de espinaca tratadas con pulsos de 15 min con una frecuencia de 2 h en forma localizada por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

A partir de estos resultados, se puede afirmar que los pulsos de luz localizada tienen un efecto parcial sobre la parte no iluminada de la hoja de espinaca. Un trabajo llevado a cabo por Tabata *et al.* (2002) utilizando luz continua sobre hojas de tabaco, llegó a la conclusión de que el contenido de AA se veía incrementado en el hemilimbo que habían sido expuesto a la luz. También detectó que la cantidad de proteína correspondiente a GLDH no se recuperaba totalmente al re-iluminar la hoja entera. Por otro lado, determinó que aumentaba considerablemente la síntesis de APX citosólica cuando las hojas eran llevadas a la luz nuevamente, como también lo han demostrado Karpinski *et al.* (1997), trabajando en hojas de *Arabidopsis thailana* L. y Gechev *et al.* (2003) en hojas de tabaco.

Por lo tanto, se puede decir que el efecto de la luz en la hoja entera produce efectos sobre la síntesis de AA, mientras que la aplicación localizada produce efectos intermedios, pero no duraderos en el tiempo para todos los indicadores fisiológicos de senescencia. Los mecanismos que regulan la síntesis de AA y el efecto de la luz no han sido extensamente estudiados, por lo que se requerirán de más experiencias en el futuro (Tabata *et al.*, 2002).

4.5.3 Efecto de los pulsos cortos de luz combinados con 1-MCP en hojas maduras de espinaca

Por un lado se ha estudiado el efecto del 1-MCP (Gergoff *et al.*, 2010b) (Capítulo IV), mientras que por otro se ha estudiado el efecto de los pulsos de luz sobre el envejecimiento y el contenido de antioxidantes en hojas maduras de espinaca (Capítulo V). En este apartado final se evaluará el efecto de la aplicación combinada de ambos factores sobre la senescencia y los antioxidantes.

Al analizar los resultados de los tratamientos con pulsos de 15 min cada 2 h ó 6 h se estimó que la frecuencia es más importante como factor para mantener altos los contenidos de antioxidantes. Por ello se decidió probar en esta sección una reducción de los pulsos a 7 min manteniendo la frecuencia de aplicación cada 2 h. De esta manera se pretendió minimizar la duración de la aplicación de pulsos de luz para aumentar la sensibilidad del tratamiento cuando se lo combinó con 1-MCP.

4.5.3.1 Efecto de los pulsos cortos de luz combinados con 1-MCP sobre la senescencia en hojas maduras de espinaca

Dentro de los parámetros de senescencia se han considerado el contenido de clorofila y F_v/F_m . El contenido de clorofila de hojas no tratadas descendió a los 3 d de haberse aplicado los tratamientos, mientras que las hojas que recibieron pulsos de luz o 1-MCP no mostraron diferencias significativas respecto del valor encontrado al momento de cosecha. Al cabo de 7 d adicionales de almacenamiento en oscuridad a 4 °C las hojas no tratadas redujeron su contenido de clorofila, manteniendo los tratamientos con pulsos cortos de luz los niveles más altos (similares al inicio de los experimentos) y el 1-MCP un valor intermedio (Figura 5.20). A su vez la apariencia de las hojas fue muy buena (Figura 5.21), no detectándose marchitamientos ni cambios en la relación PS/PF (datos no mostrados).

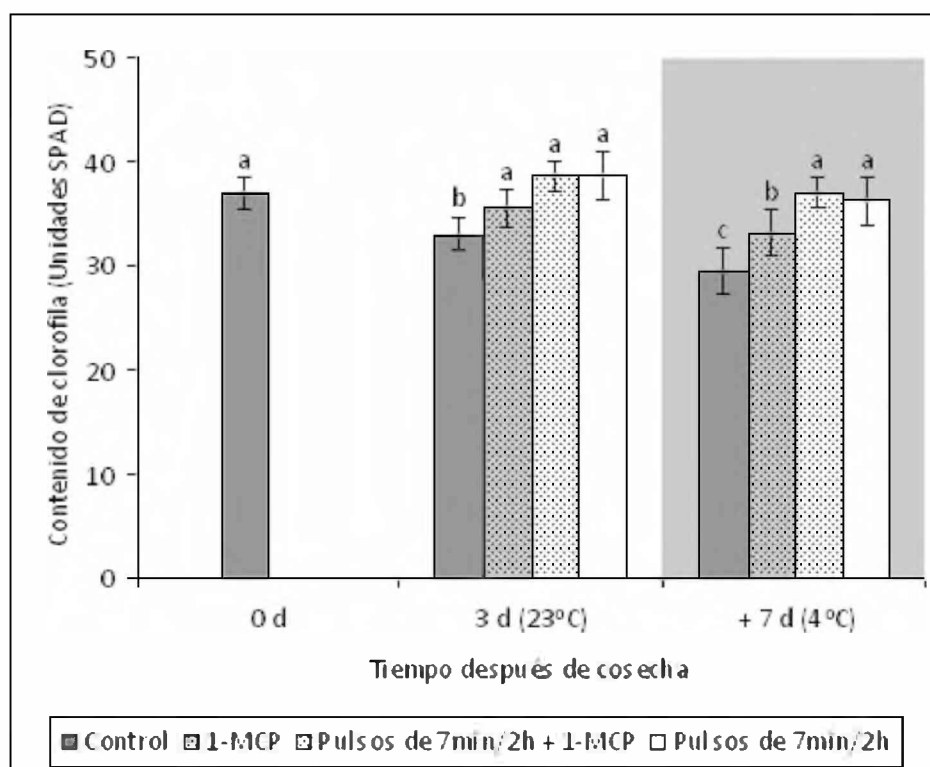


Figura 5.20 Contenido de clorofila en hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de 1,0 μL de 1-MCP combinado con pulsos de 7 minutos con una frecuencia de 2 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

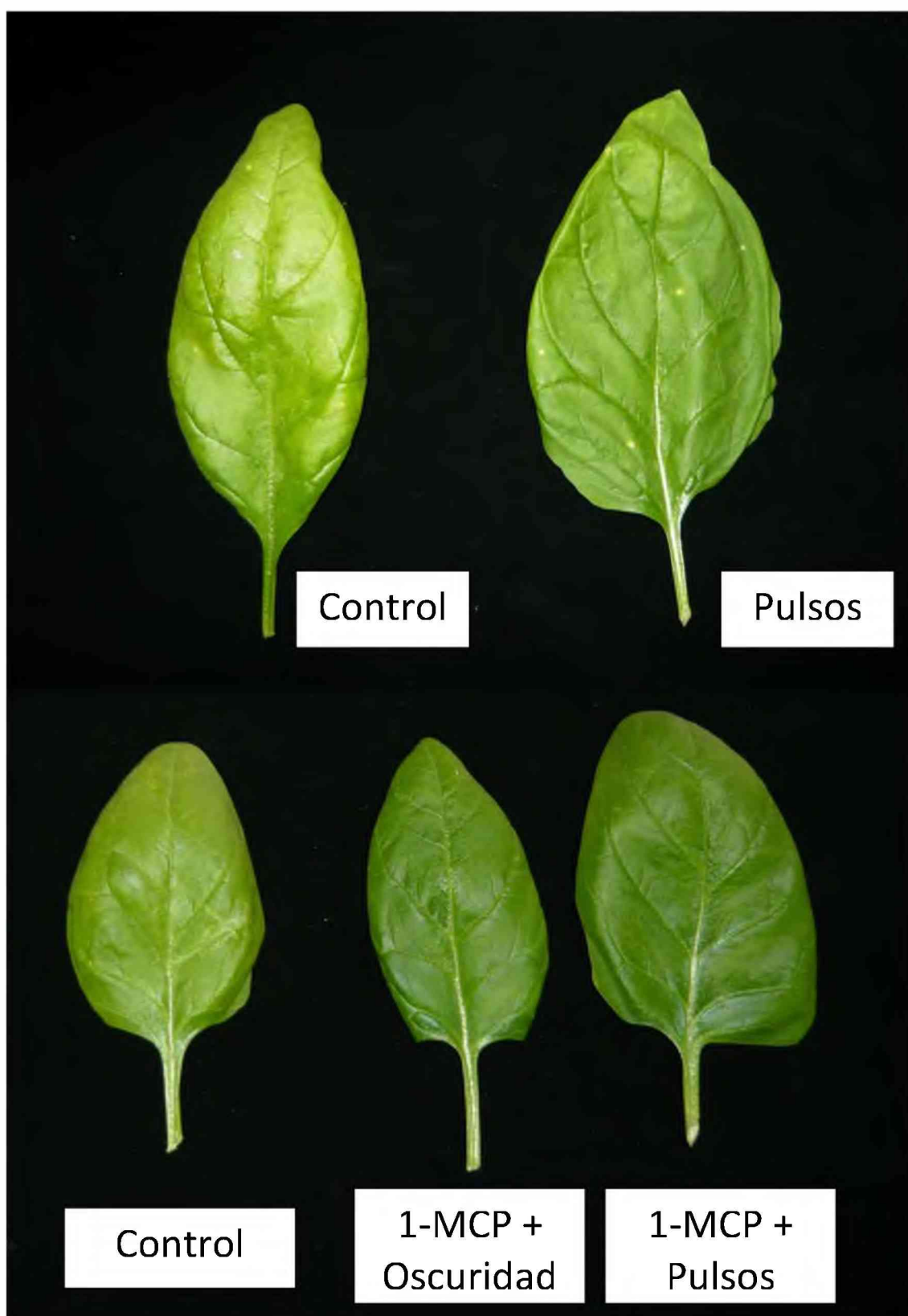


Figura 5.21 Hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP combinado con pulsos de 7 min con una frecuencia de 2 h por 3 d a 23°C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4°C .

El F_v/F_m mostró la misma tendencia que el contenido de clorofila, aunque no se detectaron diferencias en el tratamiento con $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP en oscuridad respecto de los tratamientos con pulsos cortos de luz (Figura 5.22).

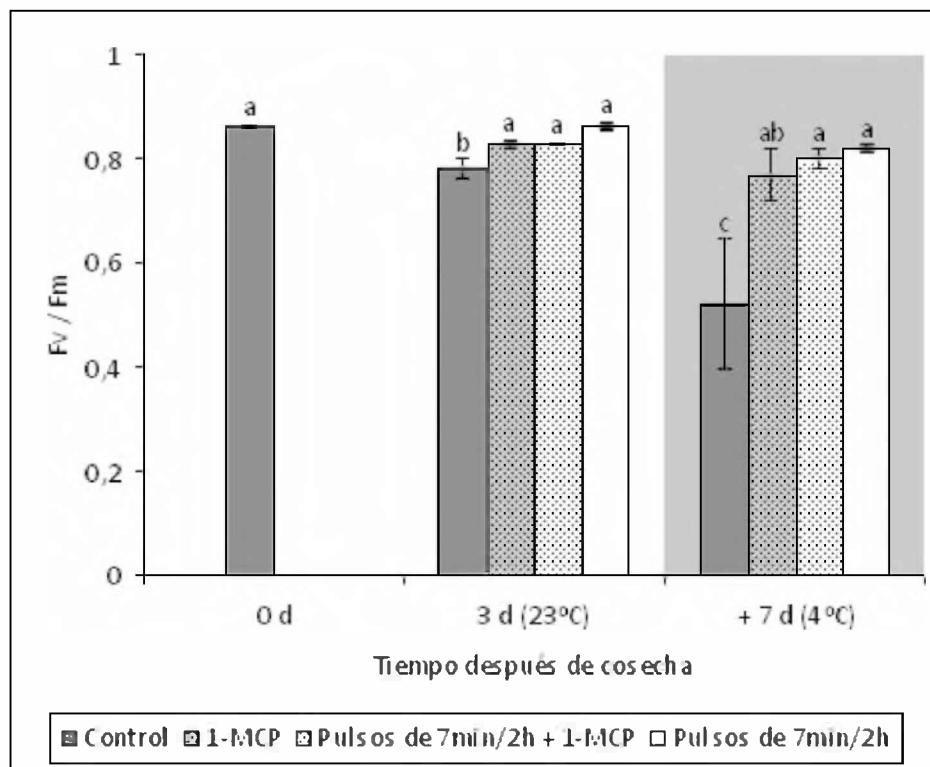


Figura 5.22 Rendimiento cuántico potencial cuántico del fotosistema II (F_v/F_m) en hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP combinado con pulsos de 7 min con una frecuencia de 2 h por 3 d a 23°C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4°C . Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

4.5.3.2 Efecto de los pulsos cortos de luz combinados con 1-MCP sobre el estrés oxidativo en hojas maduras de espinaca

Para medir el estrés oxidativo se determinaron la actividad de catalasa y la liberación *in vivo* de H_2O_2 . Al analizar la actividad de catalasa, a los 3 d se ve un fuerte aumento en el tratamiento con $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP en oscuridad, manteniéndose el resto en valores inferiores. Al almacenar las hojas en oscuridad, se ve que solamente el tratamiento con pulsos de luz disminuye la actividad de catalasa, aumentando en el resto de los tratamientos (Figura 5.23).

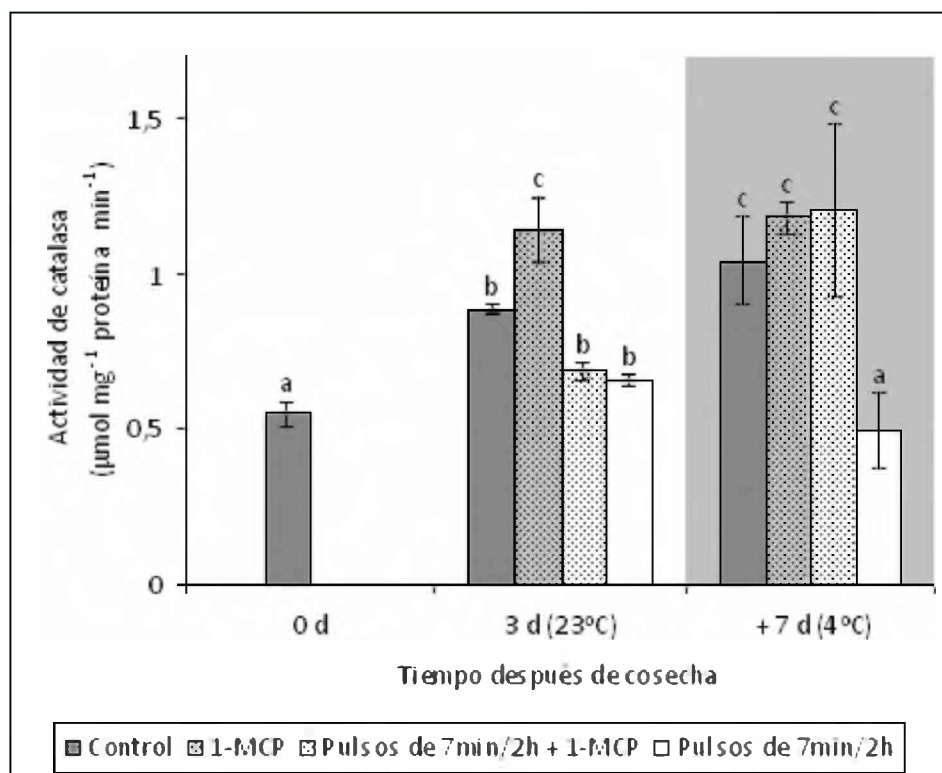


Figura 5.23 Actividad de catalasa en hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP combinado con pulsos de 7 min con una frecuencia de 2 h por 3 d a 23°C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4°C . Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Por otro lado, la liberación de H_2O_2 se ve fuertemente disminuida a los 3 d de haber aplicado pulsos de luz en el tratamiento donde se combinan pulsos y 1-MCP. A los 6 d, solamente el tratamiento control en oscuridad y sin la aplicación de 1-MCP se eleva por encima del resto de los tratamientos (Figura 5.24).

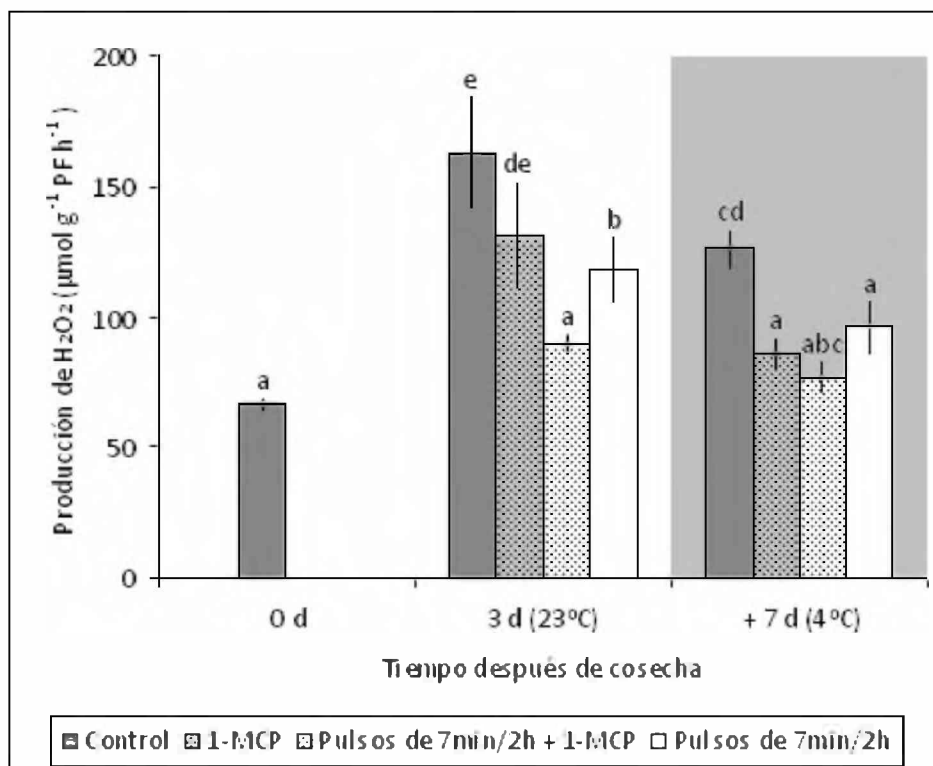


Figura 5.24 Liberación de H_2O_2 *in vivo* en hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de $1,0 \mu L L^{-1}$ de 1-MCP combinado con pulsos de 7 min con una frecuencia de 2 h por 3 d a $23^\circ C$ y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a $4^\circ C$. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

4.5.3.3 Efecto de los pulsos cortos de luz combinados con 1-MCP sobre el contenido de antioxidantes hidrosolubles en hojas maduras de espinaca

La concentración de compuestos bioactivos en frutas y hortalizas se encuentran influenciados por una serie de factores como son el fenotipo, el clima donde se las cultiva, las prácticas de cultivo, el estado de crecimiento al momento de la cosecha, como así también el modo de cosecha y la postcosecha (Lee & Kader, 2000; Gil *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 1999; Patil *et al.*, 1995; Olsson *et al.*, 2004). Se ha determinado también que el contenido de AA en espinaca se ve influenciado por la edad de la hoja, siendo las hojas más jóvenes las que muestran mayores contenidos (Bergquist, *et al.*, 2006 y Capítulo II de la presente tesis), como así también por los métodos utilizados en

el almacenamiento postcosecha (Gergoff *et al.*, 2010a; Gergoff *et al.*, 2010b; Gomez *et al.*, 2008; Bergquist *et al.*, 2006; Favell, 1998).

Por un lado, la pérdida de AA se ve fuertemente disminuida por la aplicación de 1-MCP en hortalizas de hoja (Watkins, 2006; Blankenship & Dole, 2003), incluyendo a la espinaca (Capítulo IV). Sin embargo, no se han realizado hasta la fecha tratamientos que combinen pulsos cortos de luz y 1-MCP en espinacas almacenadas a distintas temperaturas.

Al analizar el contenido de AA, a los 3 d, los tratamientos con pulsos cortos de luz con y sin la aplicación de 1-MCP mostraron valores mayores respecto del control. El tratamiento individual con 1-MCP mantenido en la oscuridad mostró valores intermedios. Al almacenar las hojas en oscuridad a 4 °C, los contenidos de AA fueron menores pero manteniendo el mismo patrón de diferencias entre tratamientos (Figura 5.25).

El estado redox del AA mostró una tendencia similar. Las muestras no tratadas siempre mostraron valores superiores en todos los casos (i.e. mayor proporción de la forma oxidada), viéndose un valor intermedio en el tratamiento con 1-MCP en oscuridad al finalizar el ensayo con frío (Figura 5.26).

Estos resultados concuerdan en parte con los hallados por Toledo *et al.* (2003), debido a que estos autores trabajando con hojas de espinaca expuestas a luz continua detectaron mayor contenido de AA en el tratamiento iluminado versus el mantenido en oscuridad. Por otro lado, determinaron aumentos en el contenido de carbohidratos como la glucosa cuando las hojas fueron iluminadas en forma continua con baja irradiancia ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De acuerdo a datos obtenidos en esta tesis, la irradiancia de los pulsos de luz coincide con el punto de compensación lumínico que se encuentra en los $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 5.1) y con una duración cercana al tiempo mínimo necesario de activación del ciclo de Calvin (von Caemmerer & Quick, 2000).

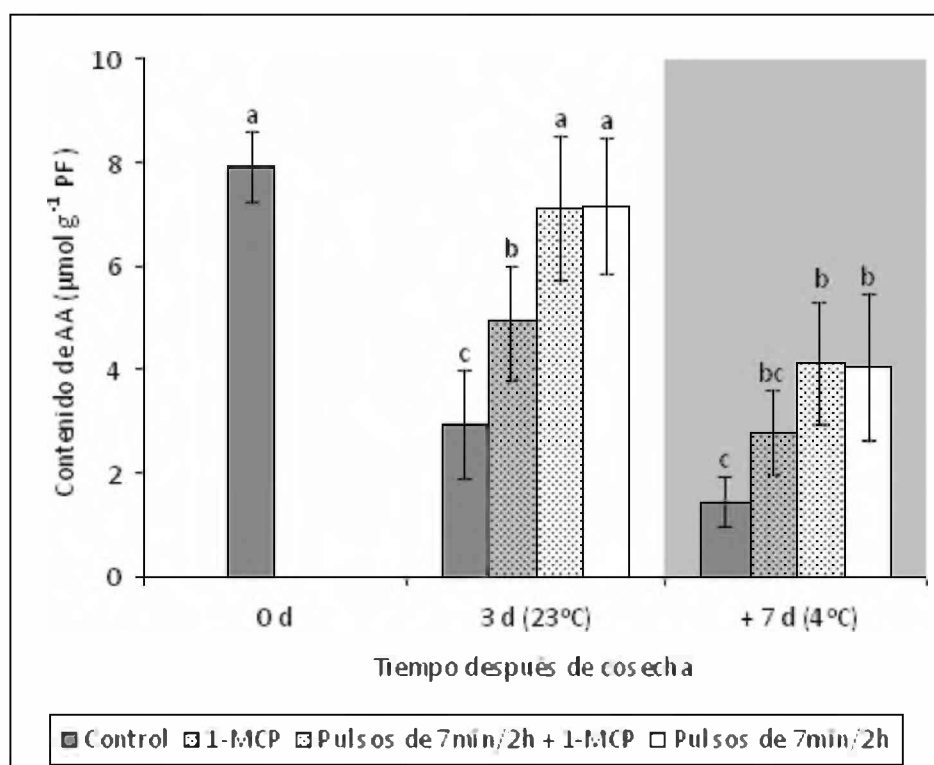


Figura 5.25 Contenido de AA en hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP combinado con pulsos de 7 min con una frecuencia de 2 h por 3 d a 23°C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4°C . Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

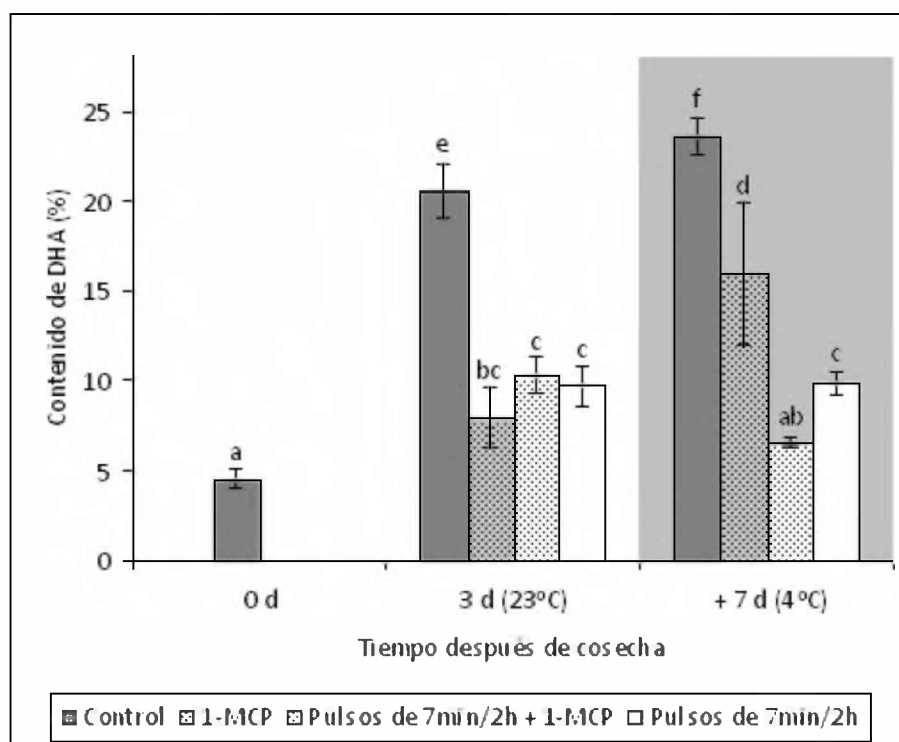


Figura 5.26 Contenido de DHA (%) en hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP combinado con pulsos de 7 min con una frecuencia de 2 h por 3 d a 23°C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4°C . Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Cuando se analizan los datos referentes al contenido de GSH, se ve claramente que el tratamiento combinando la aplicación de pulsos cortos de luz con 1-MCP produce un aumento significativo de un 77 % respecto del valor inicial a los 3 d de cosechadas las espinacas. Luego de los 7 d de refrigeración, estas diferencias se mantienen, aumentando este tratamiento hasta llegar a un 97 % de aumento. Los tratamientos individuales de oscuridad con 1-MCP y el tratamiento con pulsos de luz mostraron valores intermedios entre el tratamiento combinado y no tratados (Figura 5.27).

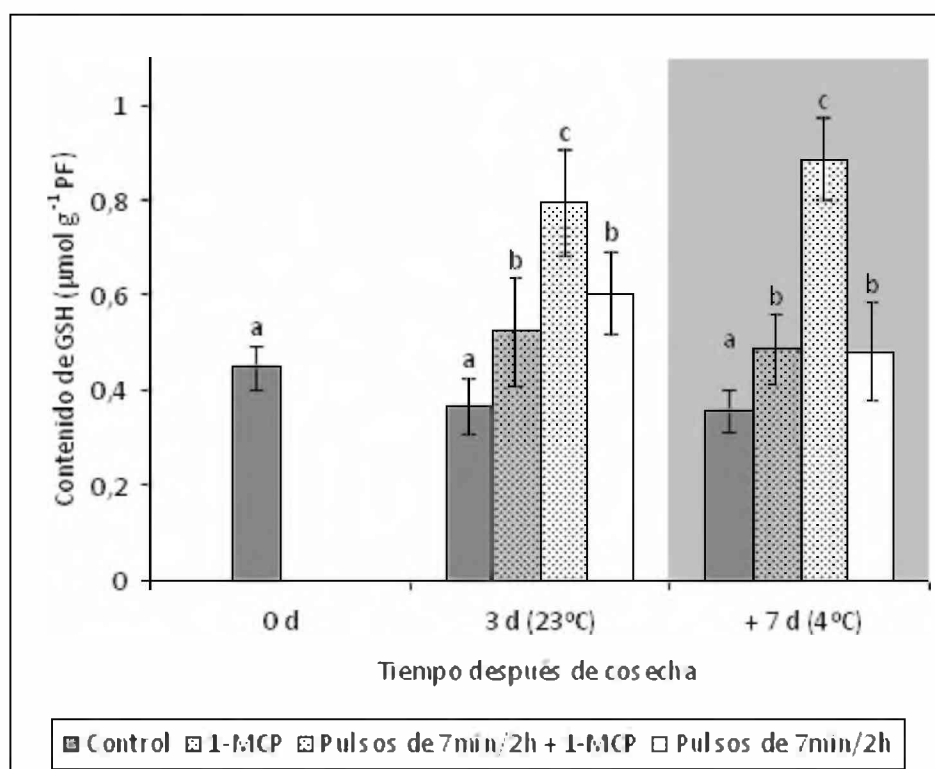


Figura 5.27 Contenido de GSH en hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP combinado con pulsos de 7 min con una frecuencia de 2 h por 3 d a 23°C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4°C . Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

En cambio, el estado redox no se modificó significativamente, manteniéndose en un valor promedio del 2,6 %. Solamente el tratamiento con 1-MCP en oscuridad mostró una disminución en la relación $\text{GSSG}/(\text{GSSG}+\text{GSH})$ respecto al control a los 3 d de haberse aplicado los pulsos de luz (Figura 5.28).

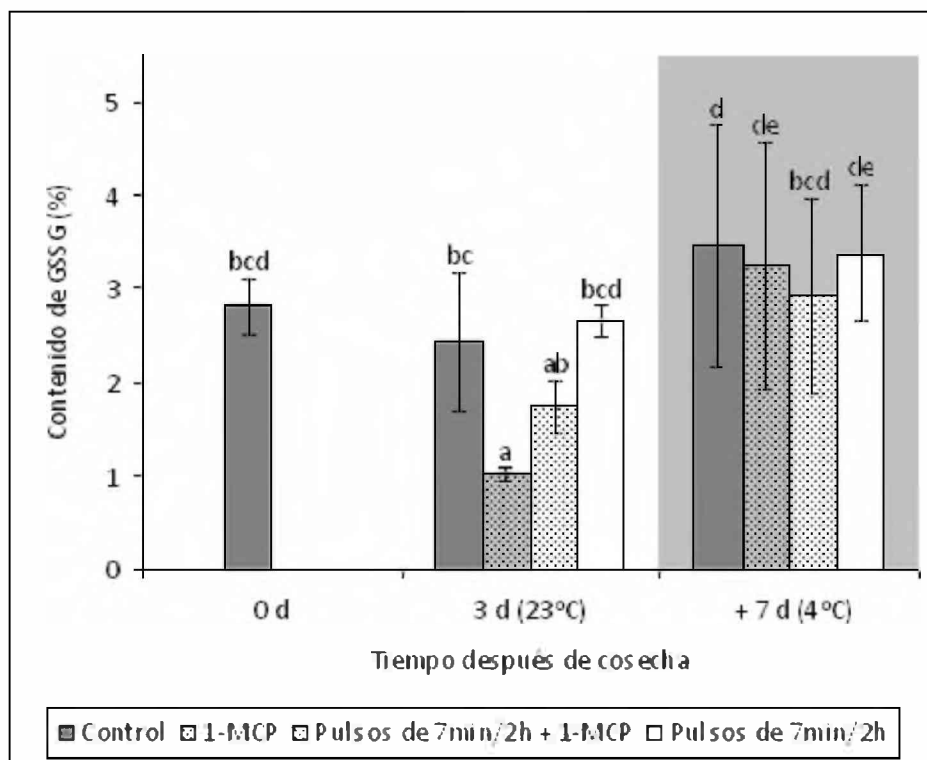


Figura 5.28 Contenido de GSSG (%) en hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP combinado con pulsos de 7 min con una frecuencia de 2 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Al analizar las actividades de enzimas involucradas en la síntesis de AA y en la reducción de sus formas oxidadas, se puede ver un fuerte efecto de los pulsos de luz, particularmente a los 3 d posteriores al corte. Como se puede observar en la Tabla 5.2, la capacidad de síntesis fue incrementada en los tratamientos de pulsos de luz individual o en combinación con 1-MCP respecto del control a los 3 d. Estas diferencias se mantienen luego que las hojas fueron almacenadas en la oscuridad otros 7 d a 4 °C. En forma similar espinacas que recibieron luz continua también aumentaron la capacidad de síntesis de este antioxidante (Toledo *et al.* 2003) cuando se incubaron con GL, el precursor de la síntesis de AA (Smirnoff, 2000).

Por otro lado, la DHAR aumentó su actividad en todos los tratamientos respecto del control a los 3 d. Al mismo tiempo, la MDHAR incrementó también su actividad en todos los tratamientos, pero en este caso las hojas no tratadas disminuyeron su actividad a casi la mitad respecto al momento de cosecha. Toledo *et al.* (2003) en este mismo sentido no encontraron diferencias significativas en la actividad de las MDHAR o

DHAR cuando aplicaron luz continua a las espinacas. Los datos aquí hallados coinciden con los contenidos de AA significativamente mayores en los tres tratamientos (Figura 5.25), como así también en el estado redox del AA (Figura 5.26), donde el control mostró los valores más altos de AA en su forma oxidada.

A los 7 d de almacenamiento en oscuridad a 4 °C, los tratamientos con pulsos luz individuales o combinados con 1-MCP mostraron capacidades de síntesis de AA mayores respecto del resto de los tratamientos (Tabla 5.2), coincidiendo con los altos contenidos de AA medidos (Figura 5.25). Por otro lado, la actividad de DHAR sólo se mantuvo incrementada por el tratamiento con 1-MCP.

Tratamientos	0 d	3 d (23°C)				+ 7d (4°C)			
	Control	Control	1-MCP	Pulsos de 7 min/2h + 1-MCP	Pulsos de 7 min/2h	Control	1-MCP	Pulsos de 7 min/2h + 1-MCP	Pulsos de 7 min/2h
Capacidad de síntesis de AA ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$)	6,7 a	3,7 b	3,6 b	5,5 a	6,2 a	2,5 c	3,1 bc	3,9 b	4,0 b
MDHAR ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$)	4,1 d	1,9 a	5,1 e	4,9 e	5,2 e	3,6 cd	3,1 bc	2,7 b	1,8 a
DHAR ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$)	14,2 ab	13,3 a	18,4 cd	17,7 cd	16,7 bc	12,2 a	20,4 de	21,8 e	12,7 a

Tabla 5.2 Capacidad de síntesis de AA, actividades de MDHAR y DHAR en hojas maduras de espinaca tratadas con una aplicación de $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP combinado con pulsos de 7 min con una frecuencia de 2 h por 3 d a 23 °C y luego mantenidas por una semana más en oscuridad a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$)

Trabajos previos han demostrado que durante la postcosecha de espinaca, el contenido de AA se ve fuertemente reducido (Gil *et al.*, 1999; Bergquist *et al.*, 2006; Favell, 1998; Hodges & Forney, 2003; Izumi *et al.*, 1997; Watada *et al.*, 1987; Gomez *et al.*, 2008; Gergoff *et al.*, 2010a, Gergoff *et al.*, 2010b), y que el contenido de AA al momento de cosecha depende fuertemente de la cantidad de luz recibida por el cultivo durante sus etapas de crecimiento (Bergquist *et al.*, 2007). Por otro lado, durante la postcosecha los procesos metabólicos son retrasados por almacenamiento a bajas temperaturas (Wills *et al.*, 1998), manteniendo la calidad (Pandurangi & LaBorde, 2004;

Bunea *et al.*, 2008; Murcia *et al.*, 2009) y disminuyendo la peroxidación lipídica y las pérdidas de clorofila (López-Ayerra *et al.*, 1998).

Al incrementar el flujo de fotones sobre hojas de espinaca, se produce un aumento del contenido de AA (Hodges *et al.*, 2001; Toledo *et al.*, 2003). Cuando las hojas fueron almacenadas en oscuridad, el contenido de AA disminuyó fuertemente (Hodges & Forney, 2000; Gergoff *et al.*, 2010a). Lester *et al.* (2010) encontraron que la iluminación con baja intensidad lumínica puede mantener la vida postcosecha de hojas de espinaca hasta por 9 d.

Sin embargo, ninguno de estos trabajos ha realizado experiencias donde la luz se aplique por pulsos. En esta última sección del capítulo se pudo comprobar que pulsos tan cortos en duración como 7 min a intervalos de 2 h, mantuvieron el contenido de AA por 3 d y aumentaron notablemente el contenido de GSH. Es decir, 1,4 h diarias contra 24 h de luz de baja irradiancia pueden llegar a tener un efecto positivo sobre la síntesis y acumulación de AA.

Se ha observado que en hojas de *Arabidopsis thaliana* L. la acumulación de AA responde a un ciclo que se repite diariamente (Tamaoki *et al.* 2003; Bartoli *et al.*, 2006). Es decir, al amanecer se detectan bajos niveles de AA y de transcriptos o actividad de la GLDH, pero que van aumentando durante el transcurso del día hasta llegar a un máximo a la tarde. Este efecto puede ser atribuido a la fotosíntesis que ocurre durante el día. Una experiencia realizada por Smirnoff & Pallanca (1996) demostró que el aumento en la síntesis de AA durante el día en hojas de cebada (*Hordeum distichum* L.) era mayor que si se añadían fuentes carbonadas como glucosa o sacarosa durante la noche. Asimismo, se ha demostrado que la síntesis de AA depende de la cadena transportadora de electrones fotosintético (Yabuta *et al.*, 2007). El tratamiento con un herbicida que bloquea la cadena de electrones fotosintética produce una fuerte disminución en la acumulación de este antioxidante (Yabuta *et al.*, 2007; Bartoli *et al.*, 2009). Esto demuestra que el efecto de la luz sobre el contenido de AA implica procesos adicionales a la provisión de esqueletos carbonados para la su síntesis. Además se ha reportado que la calidad de la luz, como la relación Rojo/Rojo lejano de la luz incidente, controla la síntesis y el estado redox del AA y el glutatión (Bartoli *et al.*, 2009) y que la síntesis puede llegar a estar determinada por efectos de relojes circadianos o fotomorfogénicos que han permitido a los vegetales poder adaptarse a

condiciones desfavorables como pueden ser radiaciones altamente dañinas (Bolige *et al.*, 2005), y que se disparen mecanismos de defensa ante este tipo de estreses. Kiyota *et al.* (2006) encontraron que la espinaca posee ritmos circadianos que influyen fuertemente sobre la síntesis de AA y que se han mantenido durante el transcurso de la evolución. En el mismo trabajo se comprobó que el alga *Euglena gracilis* posee también ritmos circadianos. Estas respuestas a la influencia de la luz demuestran una adaptación temprana a la protección contra las EAO producidas durante la fotosíntesis (Bolige *et al.*, 2005); sin embargo existe un desfase entre el pico de actividad fotosintética, que se produce al mediodía, y el pico de producción de AA, que se produce hacia el anochecer (Tamaoki *et al.*, 2003, Kiyota *et al.*, 2006).

Los resultados reportados en este capítulo contribuyen a entender los mecanismos de acumulación de AA y GSH y su relación con la luz. Por otro lado, la aplicación de pulsos de luz combinados con 1-MCP permite extender el almacenamiento y mejorar la calidad postcosecha de espinacas con una metodología limpia desde el punto de vista ambiental y de la salud humana.

5. Conclusiones

5. Conclusiones

1. Aplicaciones exógenas de etileno aceleran la senescencia a las 72 h sólo en hojas maduras de espinaca, evidenciándose en una baja en el contenido de clorofila y un aumento en la fuga de solutos. Por otro lado, las hojas jóvenes no evidencian síntomas característicos del síndrome de la senescencia durante el período ensayado.
2. El etileno tiene un fuerte efecto sobre los antioxidantes en las hojas maduras de espinaca. Los tratamientos con aplicación exógena de etileno produjeron una disminución significativa del AA a las 48 h de haber hecho el tratamiento; es decir antes de que los síntomas característicos de la senescencia, como la pérdida de clorofila, la fuga de solutos o el rendimiento potencial del fotosistema II, se hagan evidentes. Por otro lado el estado redox del AA se encuentra más oxidado con la aplicación de etileno.
3. El etileno endógeno participa en la senescencia de hojas maduras de espinaca sometidas a oscuridad; se ha demostrado que el 1-MCP, inhibidor de la respuesta al etileno, mantiene el contenido de AA en niveles mayores al control no tratado.
4. La producción de etileno endógeno modifica el contenido de AA en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. El mutante de respuesta constitutiva al etileno (*ctr1-1*) presenta un menor contenido de AA, mientras que los mutantes insensibles al etileno (*ein2-1*, *ein3-1* y *ein4*) presentaron mayores contenidos de AA respecto del silvestre.
5. El mutante de respuesta constitutiva al etileno (*ctr1-1*) y el silvestre presentan una alta correlación entre las concentraciones de α - y γ -tocoferoles, mientras que los mutantes insensibles a esta hormona (*ein2-1*, *ein3-1* y *ein4*) se comportan de manera diferente. Estos resultados sugieren que el etileno podría estar actuando sobre la síntesis de este grupo de antioxidantes. Sin embargo se requerirá de más trabajo para detectar si la enzima clave es la γ -TMT u otra durante toda la cadena de síntesis.
6. Uno de los factores físicos que determina el contenido de AA es la luz. La aplicación de pulsos discretos de luz de baja irradiancia, en el punto de

compensación lumínico de hojas maduras de espinaca, hacen que se mantenga el contenido de AA por 3 d, conservándose las diferencias hasta los 7 d posteriores en oscuridad a bajas temperaturas.

7. Los pulsos de luz influyen en el contenido de AA, más por su frecuencia que por su duración. Pulsos más cortos, pero más frecuentes tienen un mejor efecto sobre el contenido de AA y GSH.
8. Los pulsos de luz aumentan el contenido de GSH significativamente, manteniéndose estas diferencias hasta los 7 d posteriores en oscuridad a bajas temperaturas.
9. La combinación de pulsos de luz de baja irradiancia con 1-MCP y refrigeración aumentaron ostensiblemente el contenido de GSH y conservaron reducido el AA. Sin embargo, no se vieron diferencias en el contenido de AA entre el tratamiento combinado con respecto al tratamiento con pulsos y refrigeración.
10. La metodología desarrollada en la presente tesis podría ser utilizada en la tecnología postcosecha de espinaca, teniendo en cuenta el rápido deterioro visual y nutricional de esta hortaliza durante la senescencia. Los métodos ajustados en la presente tesis se han centrado en tecnologías limpias y de bajo costo, pudiéndose usar en gran escala y permitiendo la mejora de los productos que son ofrecidos a los consumidores.

6. Referencias

6. Referencias

- Abbasi, A.R., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U., Voll, L.M. 2007. Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology* 143: 1720–1738
- Abeles, E.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E. Jr. (Editores). 1992. *Ethylene in Plant Biology* (2nd ed.). Academic Press, New York, 414 pp.
- Adams, D.O. & Yang, S.F. 1979. Ethylene biosynthesis: Identification of l-aminocyclopropane-L-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 76: 170-174.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126
- Aharoni, N. & Lieberman, M. 1979. Ethylene as a rRegulador of senescence in tobacco leaf discs. *Physiologia Plantarum* 64: 801-804
- Alcain, F.J. & Buron, M.I. 1994. Effect of ascorbate on cell growth and differentiation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26: 393-398
- Allan, A.C. & Fluhr, R. 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9: 1559–1572
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., Ecker, J.R. 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148-2152
- Alonso, J.M. & Stepanova A.N. 2004. The Ethylene Signaling Pathway. *Science* 306: 1513-1515
- Amako, K., Chen, G., Asada, K. 1994. Separate assay specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology* 35: 497-504
- Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399
- Arrigoni, O. & De Tullio, M.C. 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology* 157: 481–488
- Arrigoni, O. & De Tullio, M.C. 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* 1569: 1-9
- Asada, K. & Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En *Photoinhibition* (Kyle, D.J. et al., eds), pp. 227–287, Elsevier
- Asada, K., 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H_2O_2 scavenging in plants. En: Scandalios, J. (Ed.) *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defences*. Cold Spring Harbor Press, New York, pp715-736
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601–639
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391–396
- Baier, M. & Dietz, K.J. 1996. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal

- thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Molecular Biology* 31: 553–564
- Baier, M. & Dietz, K.J. 1997. The plant 2-cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear encoded chloroplast protein: its expresión regulation, phylogenetic origin and implications for its specific physiological function in plants. *The Plant Journal* 12: 179–190
- Baier, M. & Dietz, K.J. 2005. Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *Journal of Experimental Botany* 56: 1449–1462
- Bailey, B.A., Dean, J.F.D., Anderson, J.D. 1990. An ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase elicits electrolyte leakage and necrosis in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi leaves. *Plant Physiology* 94: 1849-1854
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrialby-products: Antioxidant activity , occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191-203
- Barclay, K.D. & McKersie, B.D. 1994. Peroxidation reactions in plant membranes: effects of free fatty acids. *Lipids* 29: 877-882
- Barth, C., Moeder, W., Klessig, D.F., Conklin, P.L. 2004. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vitamin c-1. *Plant Physiology* 134: 1784-1792
- Barth, C., De Tullio, M., Conklin P.L. 2006. The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* 57: 1657-1665
- Bartley, G.E. & Scolnik, P.A. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* 7: 1027-1038
- Bartoli, C.G., Simontacchi M., Montaldi, E., Puntarulo, S. 1996. Oxidative stress, antioxidant capacity and ethylene production during ageing of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals. *Journal of Experimental Botany* 47: 595-601
- Bartoli, C.G., Pastori, G., Foyer, C.H. 2000. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between Complexes III and IV. *Plant Physiology* 123: 335-343
- Bartoli, C.G., Gómez, F., Martínez, D.E., Guamet, J.J. 2004. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 55: 1663-1669
- Bartoli, C.G., Guamet, J.J., Kiddle, G., Pastori, G., Di Cagno, R., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H. 2005a. Ascorbate content of wheat leaves is not determinated by maximal L-galactone-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant Cell and Environment* 28: 1073-1081
- Bartoli, C.G., Gómez, F., Gergoff, G., Guamet, J.J., Puntarulo, S. 2005b. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany* 56: 1269-1276
- Bartoli, C.G., Yu, J., Gómez, F., Fernández, L., McIntosh, L., Foyer, C.H. 2006. Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* 57: 1621-1631

- Bartoli, C.G., Tambussi, A.E., Fanello, D., Foyer, C.H. 2009. Control of ascorbic acid synthesis and accumulation and glutathione by the incident light red/far red ratio in *Phaseolus vulgaris* leaves. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 583: 118–122
- Berger, S., Weichert, H., Porzel, A., Wasternack, C., Kuhn, H., & Feußner, I. 2001. Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1533: 266–276
- Bergmüller, E., Porfirova, S., Dörmann, P. 2003. Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in γ -tocopherol methyltransferase. *Plant Molecular Biology* 52: 1181–1190
- Bergquist, S.Å.M., Gertsson, U.E., Olsson, M.E. 2006. Influence of growth stage and postharvest storage on ascorbic acid and carotenoid content and visual quality of baby spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 346–355
- Bergquist, S.Å.M., Gertsson, U.E., Nordmark, L.Y.G., Olsson, M.E. 2007. Ascorbic acid, carotenoids, and visual quality of baby spinach as affected by shade netting and postharvest storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8444–8451
- Blankenship, S.M. & Dole, J.M. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology* 28: 1-25
- Bleecker, A.B. 1999. Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 4: 269-274
- Bleecker, A.B. & Kende, H. 2000. ETHYLENE: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 1-18
- Bolige, A., Kiyota, M., Goto, K. 2005. Circadian rhythms of resistance to UV-C and UV-B radiation in *Euglena* as related to “escape from light” and “resistance to light”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 81: 43–54
- Booth, V.H. 1964. The rise in tocopherol content in wilting and in non-illuminated leaves. *Phytochemistry* 3: 273-276
- Borracino, G., Mastropasqua, L., De Leonardis, S., Dipierro, S. 1994. The role of the ascorbic acid system in delaying the senescence of oat (*Avena sativa* L.) leaf segments. *Journal of Plant Physiology* 144: 161-166
- Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., Trakatellis, A.G. 1994. Rapid sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1931-1937
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D. 1992. Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83–116
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Maions, Y., Roxborough, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A., Wagner, K-H. 2000. Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 913-938

- Briggs, W.R. & Olney, M.A. 2001. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiology* 125: 85–88
- Buchanan-Wolaston, V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 48: 181-199
- Bukhov, N.G. 2004. Dynamic light regulation of photosynthesis (A review). *Russian Journal of Plant Physiology* 51: 742-753
- Bunea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M., Verhé, R., Van Camp, J. 2008. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry* 108: 649-656
- Bürstenbinder, K., Rzewuski, G., Wirtz, M., Hell, R., Sauter, M. 2007. The role of methionine recycling for ethylene synthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 49: 238-249
- Burton, G. W. & Ingold, K. U. 1984. β -Carotene: an unusual type of antioxidant. *Science* 224: 569–573.
- Buwalda, F., Stulen, I., De Kok, L.J., Kuiper, P.J.C. 1990. Cysteine, γ -glutamyl-cysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. II. Glutathione accumulation in detached leaves exposed to H_2S in the absence of light is stimulated by the supply of glycine to the petiole. *Physiologia Plantarum* 80: 196-204
- Cameron, A.C. & Reid, M.S., 1981. The use of silver anionic complex as a foliar spray to prevent flower abscission of Zygocactus. *HortScience* 16: 761–762
- Campos, P., Quartin, V., Ramalho, J., Nunes, M. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 283–292
- Cantwell, M.I. & Kasmire, R.F. 2003. Postharvest handling systems: flower, leafy and stem vegetables. En: Kader, A.A. (Ed.) *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Publication 3311. University of California Agriculture and Natural Resources, pp. 423-433
- Cazzonelli, C.I. & Pogson, B.J. 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 15: 266-274
- Chatterjee, I.B. 1973. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science* 182: 1271-1272
- Chen, Y-F., Etheridge, N., Schaller G.E. 2005. Ethylene signal transduction. *Annals of Botany* 95: 901–915
- Chen, Z., Young, T.E., Ling, J., Chang, S., Gallie, D.R. 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 3525–3530
- Chow, B. & McCourt, P. 2006. Plant hormone receptors: perception is everything. *Genes & Development* 20: 1998-2008
- Código Alimentario Argentino. Ley 18.284 – 18 de julio de 1969. Capítulo XI “Alimentos Vegetales”.
- Collakova, E. & DellaPenna, D. 2003. The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiology* 133: 930–940

- Colville, L. & Smirnoff, N. 2008. Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient *Arabidopsis thaliana* vtc mutants. *Journal of Experimental Botany* 59: 3857–3868
- Conklin, P.L., Williams, E.H., Last R.L. 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America* 93: 9970-9974
- Conklin, P.L. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment* 24: 383–394
- Conklin, P.L. & Barth, C. 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment* 27: 959–970
- Cordoba, F. & Gonzales-Reyes, J.A. 1994. Ascorbate and plant cell growth. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26: 399-405
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., del Río, L.A. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 145–150
- Cummings, M.J. & Mattill, H.A. 1931. The auto-oxidation of fats with reference to their destructive effect on vitamin E. *Journal of Nutrition* 3: 421–432
- Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R. 1999. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *The Plant Journal* 18: 285-292
- D’Aquino, S., Piga, A., Agabbio, M., McCollum, T.G. 1998. Film wrapping delays ageing of ‘Minneola’ tangelos under shelf-life conditions. *Postharvest Biology and Technology* 14: 107–116
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science* 57: 779–795
- Daulaire, N.M.P., Starbuck, E.S., Houston, R.M., Church, M.S., Stukel, T.A., Pandey, M.R., 1992. Childhood mortality after a high dose of vitamin A in a high risk population. *British Medical Journal* 304: 207-210
- Davey, M.W., Van Montagu, M., Sanmatin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 825-860
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D. J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., Mittler, R. 2005. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 268-281
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., Mittler, R. 2005. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 847-856
- De Cabo, R.C., Gonzalez-Reyes, J.A., Nava, P. 1993. The onset of cell proliferation is stimulated by ascorbate free radical in onion primordia. *Biology of the Cell* 77: 231-233
- De Ell, J.R. & Toivonen, P.M.A. 2000. Chlorophyll fluorescence as a non destructive indicator of broccoli quality during storage in modified atmosphere packaging. *HortScience* 35: 256-259

- De Gara, L., de Pinto, M.C., Arrigoni, O. 1997. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stages of wheat germination. *Physiologia Plantarum* 100: 894-900
- De Gara, L., Paciolla, C., De Tullio, M.C., Motto, M., Arrigoni, O. 2000. Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum* 109: 7-13
- De Jong, A.J., Yakimova, E.T., Kapchina, V.M., Woltering, E.J. 2002. A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* 214: 537-545
- De Pinto, M.C., Francis, D., De Gara, L. 1999. The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 209: 90-97
- De Tullio, M.C., Paciolla, C., Dalla Vecchia, F., Rascio, N., D'Emérico, S., De Gara, L., Liso, R., Arrigoni, O. 1999. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209: 424-434
- Dean, J.D., Goodwin P.H., Hsiang, T. 2005. Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. Orbiculare* and involvement of one in resistance. *Journal of Experimental Botany* 56: 1525-1533
- del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J. 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141: 330-335
- DellaPenna, D. 2005a. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal of Plant Physiology* 162: 729-737
- DellaPenna, D. 2005b. Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends in Plant Science* 10: 574-579
- DellaPena, D. & Pogson, B.J. 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review in Plant Biology* 57: 711-38
- DeLong, J.M. & Steffen, 1997. Photosynthetic function, lipid peroxidation, and α -tocopherol content in spinach leaves during exposure to UV-B radiation. *Canadian Journal of Plant Science* 77: 453-459
- Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R. 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 258-266
- Dörmann, P. 2007. Functional diversity of tocochromanols in plants. *Planta* 225: 269-276
- Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., Smirnoff, N. 2007. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal* 52: 673-689

- Droog, F. N. J., Hooykaas, P. J. J., Libbenga, K. R., van der Zaal, E. J. 1993. Proteins encoded by an auxin-regulated gene family of tobacco share limited but significant homology with glutathione S-transferases and one member indeed shows in vitro GST activity. *Plant Molecular Biology* 21: 965-972
- Dudler, R., Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J. & Mauch, F. 1991. A Pathogen-Induced Wheat Gene Encodes a Protein Homologous to Glutathione-S-Transferases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 14-18
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chetrit, P., Foyer, C.H., de Paepe, R. 2003. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *The Plant Cell* 15: 1212-1226
- Emerson, O.H., Emerson, G.A., Mohammad, A., Evans, H.M. 1937. The chemistry of vitamin E. Tocopherols from various sources. *Journal of Biological Chemistry* 122: 99-107
- Eskling, M.; Arvidsson, P-O.; Åkerlund, H-E. 1997. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum* 100: 806-816
- Etheridge, N., Chen, Y-F., Schaller, G.E. 2005. Dissecting the ethylene pathway of *Arabidopsis*. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 3: 372-381
- Etheridge, N., Hall, B.P., Schaller G.E. 2006. Progress report: Ethylene signaling and responses. *Planta* 223: 387-391
- Evans, H.M., Emerson, O.H., Emerson, G.A. 1936. The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamin E. *Journal of Biological Chemistry* 113: 319-332
- Falk, J., Andersen, G., Kernebeck, B., Krupinska, K. 2003. Constitutive overexpression of barley 4-hydroxypheylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Letters* 540: 35-40
- Favell, D.J. 1998. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry* 62: 59-64
- Fernholz, E. 1938. On the constitution of α -tocopherol. *Journal of the American Chemical Society* 60: 700-705
- Ferrante, A. & Francini, A. 2006. Ethylene and leaf senescence. In: Khan, N.A. (Ed.). *Ethylene Action in Plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 51-67
- Field, R.J. 1981a. A relationship between membrane permeability and ethylene production at high temperature in leaf tissue of *Phaseolus vulgaris* L. *Annals of Botany* 48: 33-39
- Field, R.J., 1981b. The effect of low temperature on ethylene production by leaf tissue of *Phaseolus vulgaris* L. *Annals of Botany* 47: 215-223
- Finch, C.E. & Cohen, D.M. 1997. Aging, metabolism, and Alzheimer's disease: review and hypotheses. *Experimental Neurology* 143: 82-102
- Foo, E., Ross, J.J., Davies, N.W., Reid, J.B., Weller, J.L. 2006. A role for ethylene in the phytochrome-mediated control of vegetative development. *The Plant Journal* 46: 911-921

- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M., Dolan, L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442–446
- Foyer, C.H. & Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25
- Foyer, C.H., Halliwell, B. 1977. Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry* 16: 1347-1350
- Foyer, C.H., Derscurvières, P., Kunert, K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17: 507-523
- Foyer, C.H. & Harbinson, J. 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport, Foyer, C.H. & Mullineaux, P.M. Editores, *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, London, pp. 1–42
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717
- Foyer, C.H. & Harbinson, J. 1999. Relationships between antioxidant metabolism and carotenoids in the regulation of photosynthesis, Frank, H.A, Young, A.J, Britton, G, Cogdell, R.J Editores , *The Photochemistry of Carotenoids*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 305–325
- Foyer, C.H., Fletcher, J.M. 2001. Plant antioxidants: Colour me healthy. *Biologist* 48: 115-120
- Foyer, C.H. & Noctor, G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355–364
- Foyer, C.H. & Noctor, G. 2005. Redox Homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875
- Foyer, C.H., Trebst, A., Noctor, G. 2008. Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione. Chapter 16. De B. Demmig-Adams, William W. Adams III, A.K. Mattoo (eds), *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*,. © Springer Science+Business Media B.V. 2008. pp. 241–268
- Foyer, C.H. & Noctor, G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidant Redox Signal* 11: 861–905
- Franceschi, V.R. & Tarlyn, N.M. 2002. L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology* 130: 649-656
- Foyer, C.H. & Noctor, G. 2011. Ascorbate and Glutathione: The heart of the Redox Hub. *Plant Physiology* 155: 2–18
- Foyer, C.H. & Shigeoka, S. 2011. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiology* 155: 93–100
- Franceschi, V.R. & Tarlyn, N.M. 2002. L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology* 130: 649-656
- Fryer, M.J. 1992. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell and Environment* 15: 381–392

- Fuhrer, J. 1982. Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* 70: 162-167
- Galvez-Valdivieso, G. & Mullineaux, P.M. 2010. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiologia Plantarum* 138: 430–439
- Gan, S. & Amasino, R. 1997. Making sense of senescence. *Plant Physiology* 113: 313-319
- Gao, Z., Chen, Y.F., Randlett, M.D., Zhao, X-C, Findell, J.L., Kieber, J.J., Schaller, G.E. 2003. Localization of the raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry* 278: 34725-34732
- Garg, O.P. & Kapoor, V. 1972. Retardation of leaf senescence by ascorbic acid. *Journal of Experimental Botany* 23: 699-703
- Gatzek, S., Wheeler, G.L., Smirnoff N. 2002. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *The Plant Journal* 30: 541-553
- Gechev, T., Willekens, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., Toneva, V., Minkov, I. 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology* 160: 509–515
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87–92
- Gergoff G., Chaves A.R., Bartoli, C.G. 2010a. Ethylene regulates ascorbic acid content during dark-induced leaf senescence. *Plant Science* 178: 207–212
- Gergoff Grozeff, G., Miceli, M.E., Gómez, F., Fernández, L., Guiamet, J.J., Chaves, A.R. Bartoli C.G. 2010b. 1-Methylcyclopropene extends postharvest life of spinach leaves. *Postharvest Biology and Technology* 55: 182–185
- Gil, M.I., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. 1999. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2213–2217
- Gomez, F., Fernández, L., Gergoff, G., Guiamet, J.J., Chaves, A., Bartoli, C.G. 2008. Heat treatment increases mitochondrial H₂O₂ production and extends postharvest life of spinach leaves. *Postharvest Biology and Technology* 49: 229-234
- Gómez, J.M., Jiménez, A., Olmos, E., Sevilla, F. 2004. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* 55: 119-130
- Gou, H. & Ecker J.R. 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Corrent Opinion in Plant Biology* 7: 40-49
- Grace, S.C. & Logan, B.A. 1996. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiology* 112: 1631–1640
- Grant, J.J. & Loake, G.J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21–29

- Grbic, V., Bleecker, A.B. 1995. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 8: 595–602
- Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106: 207-212
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific c-glutamylcyst- eine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatinsynthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6838–6842
- Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 439–443
- Gross, J. & Ohad, I. 1983. *In vivo* fluorescence spectroscopy of chlorophyll in various unripe and ripe fruit. *Photochemistry Photobiology* 37: 195-200
- Grusak, M.A. 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 133-161
- Guo, H. & Ecker, J.R. 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 40–49
- Halliwell, B. & Foyer, C.H. 1976. Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochemical Journal* 155: 697-700
- Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A. 2005. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition* 81(1): 268S-276S
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773–1791
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 11: 298–300
- Hase, S., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. 2003. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 219-226
- Haworth, W.H. 1932. Hexuronic acid as the antiscorbutic factor. *Nature* 129: 576
- He, Y. & Gan, S. 2002. A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 805–15
- Heazlewood, J.L., Howell, K.A., Millar, A.H. 2003. Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1604: 159– 169

- Hensel, L.L., Grbic, V., Baumgarten, D.A., Bleecker, A.B. 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. *The Plant Cell* 5: 553-564
- Herschbach, C. & Rennenberg, H. 1994. Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* 45: 1069-1076
- Hertwig, B., Streb, P., Feierabend, J. 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology* 100: 1547-1553
- Hirayama, T. & Alonso, J.M. 2000. Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. *Plant and Cell Physiology* 41: 548-555
- Hodges, D.M., Andrews C.J., Johnson, D.A., Hamilton, R.I. 1996. Antioxidant compound responses of chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiologia Plantarum* 98: 685-692
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A., Hamilton, R.I. 1997a. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Journal of Experimental Botany* 48: 1105-1113
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A., Hamilton, R.I. 1997b. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop Science* 37: 857-863
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C. F., Prange, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611
- Hodges, D.M. & Forney, C.F. 2000. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. *Journal of Experimental Botany* 51: 645-655
- Hodges, D.M., Wismer, W.V., Forney, C.F. 2001. Antioxidant responses in postharvest leaves of two cultivars of spinach (*Spinacia oleracea* L.) differing in their senescence rates. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 126: 611-617
- Hodges, D.M. 2003. Overview: oxidative stress and postharvest produce, pp 1-23. En D.M. Hodges (editor). *Postharvest oxidative stress in horticultural crops*. Haworth Press, Binghampton, Nueva York. Estados Unidos.
- Hodges, D.M. & Forney, C.F. 2003. Postharvest ascorbate metabolism in two cultivars of spinach differing in their senescence rates. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 128: 930-935
- Hodges, D.M., Lester, G.E., Munro, K.D., Toivonen, P.M.A. 2004. Oxidative stress: importance for postharvest quality. *HortScience* 39: 924-929
- Hoeberichts, F.A., Van Der Plas, L.H.W., Woltering, E.J. 2002. Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biology and Technology* 26: 125-133
- Holst, A. & Frölich, T. 1907. Experimental studies relating to shipberi-beri and scurvy. II. On the etiology of scurvy. *Journal of Hygiene* 7: 634- 671

- Horemans, N., Asard, H., Caubergs, R.J. 1994. The role of the ascorbate free radical as an electron acceptor to cytochrome b-mediated trans-plasma membrane electron transport in higher plants. *Plant Physiology* 104: 1455-1458
- Hörtensteiner, S., Matile, P. 2004. How leaves turn yellow: catabolism of chlorophyll, in: L.D. Noodén (Ed.), *Plant Cell Death Processes*, Elsevier Academic Press, pp. 189–202
- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, J., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., Horemans, N. 2006. Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues. *Phytochemistry* 67: 1185-1195
- Howard, L.A., Wong, A.D., Perry, A. K., Klein, B.P. 1999. Betacarotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. *Journal of Food Science* 64: 929–936
- Hua J. & Meyerowitz, E.M. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261–271
- Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.G., Bleecker, A.B., Ecker, J.R., Meyerowitz, E.M. 1998. *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 1321–1332
- Imai T., Kingston-Smith A., Foyer C.H. 1999. Ascorbate metabolism in potato leaves supplied with exogenous ascorbate. *Free Radical Research* 31: 171–179
- Imaseki, H. 1991. The biochemistry of ethylene biosynthesis. En: Mattoo, A.K. & Suttle, J.C. (Eds.), *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-20
- Innocenti, A.M., Bitonti, M.B., Arrigoni, O. 1990. The size of quiescent centre in roots of *Allium cepa* L. Grown with ascorbic acid. *New Phytologist* 114: 507-509
- Ischebeck, T., Zbierzak, A.M., Kanwischer, M. & Dörmann, P. 2006. A salvage pathway for phytol metabolism in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 2470–2477
- Ishikawa, T. & Shigeoka, S. 2008. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72: 1143–1154
- Ishikawa, T., Dowdle, J., Smirnoff, N., 2006 Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum* 126: 343–355
- Itzhaki, H., Maxson, J.M., Woodsont, W.R. 1994. An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GSTI) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8925-8929
- Izumi, H., Nonaka, T., Muraoka, T. 1997. Physiology and quality of fresh-cut spinach stored in low O₂ controlled atmospheres at various temperatures. En *CA'97 proceedings Volume 5: Freshcut fruits and Vegetables and MAP*; Gorny, J. R., Ed.; University of California: Davis, CA; pp 130–133
- Jain, M., Nandwal, A.S., Kundu, B.S., Kumar, B., Sheoran, I.S., Kumar, N., Mann, N., Kukreja, S. 2006. Water relations, activities of antioxidants, ethylene evolution and membrane integrity of pigeonpea roots as affected by soil moisture. *Biologia Plantarum* 50: 303-306
- Jenner, P. 1996. Oxidative stress in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Pathologia Biologica* 44: 57– 64

- Jiang, W., Sheng, Q., Zhou, X-J, Zhang, M-J, Liu, X-J. 2002. Regulation of detached coriander leaf senescence by 1-methylcyclopropene and ethylene. *Postharvest Biology and Technology* 26: 339–345
- Jiménez, A., Hernández, J.A., Pastori, G., del Río, L.A., Sevilla, F. 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* 118: 1327-1335
- Jiménez, A., Romojaro, F., Gomez, J.M., Llanos, M.R., Sevilla, F. 2003. Antioxidant systems and their relationship with the response of pepper fruits to storage at 20 degrees Celsius. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry* 51: 6293-6299
- Jing, H-C., Sturre, M.J., Hille, J., Dijkwel, P.P. 2002. Arabidopsis onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *The Plant Journal* 32: 51–63
- Jing, H-C., Schippers, J.H.M., Hille, J., Dijkwel, P.P. 2005. Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and OLD genes in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 56: 2915-2923
- Johnson, P.R & Ecker, J. R. 1998. The Ethylene Gas Signal Transduction Pathway: A Molecular Perspective. *Annual Review of Genetics* 32: 227-254
- Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N., A., Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Taglialatela, G., Bickford, P.C. 1998. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *The Journal of Neuroscience* 18: 8047–8055
- Kader, A. 2002. Postharvest Technology of horticultural crops. Third Edition. University of California. *Publication 3311*. Cap. 4.
- Kanasawa, S., Sano, S., Koshiba, T., Ushimaru, T. 2000. Change in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence. *Physiologia Plantarum* 109: 211-216
- Kanwischer M., Porfirova S., Bergmüller E., Dörmann P. 2005. Alterations in Tocopherol Cyclase Activity in Transgenic and Mutant Plants of Arabidopsis Affect Tocopherol Content, Tocopherol Composition, and Oxidative Stress. *Plant Physiology* 137: 713–723
- Kariola, T., Brader, G., Li, J., Palva, E.T. 2005. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *The Plant Cell* 17: 282–294
- Karpinski, S., Escobar, C., Kaprinska, B., Creissen, G., Mullineaux, P.M. 1997. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress. *Plant Cell* 9: 627–640
- Karrer, P., Fritzsche, H., Rinier, B.H., Salomon, H. 1938. Synthese des α -Tocopherols. *Helvetica Chimica Acta* 21: 820–825
- Kato, M., Kamo, T., Wang, R., Nishikawa, F., Hyodo, H., Ikoma, Y., Sugiura, M., Yano, M. 2002. Wound-induced ethylene synthesis in stem tissue of harvested broccoli and its effect on senescence and ethylene synthesis in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology* 24: 69-78
- Kaup, M.T., Froese, C.D., Thompson, J.E. 2002. A role of diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiology* 129: 1616–1626

- Keller, R., Springer, F., Renz, A., Kossmann, J. 1999. Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *The Plant Journal* 19: 131-141
- Kende, H. 1989. Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiology* 91: 1-4
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 283-307
- Kikunaga, S., Ishii, H., Takahashi, M. 1995. The bioavailability of magnesium in spinach and the effect of oxalic acid and magnesium utilization examined in diets of magnesium-deficient rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 41: 671-685
- Kingston-Smith, A.H., Thomas, H., Foyer, C.H. 1997. Chlorophyll a fluorescence, enzyme and antioxidant analyses provide evidence for the operation of alternative electron sinks during leaf senescence in a stay-green mutant of *Festuca pratensis*. *Plant, Cell and Environment* 20: 1323-1337
- Kiyota, M., Numayama, N., Goto K. 2006. Circadian rhythms of the L-ascorbic acid level in *Euglena* and spinach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 84: 197-203
- Klee, H.J. 2004. Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis. *Plant Physiology* 135: 660-667.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M., Jansch, L., Braun, H-P. 2010. Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 22: 797-810
- Kopriva, S. 2005. Regulation of Sulfate Assimilation in *Arabidopsis* and Beyond. *Annals of Botany* 97: 479-495
- Kostman, T.A., Tarlyn, N.M., Loewus, F.A., Franceschi, V.R. 2001. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiology* 125: 634-640
- Koukounaras, A., Siomos, A.S., Sfakiotakis, E. 2007. Postharvest CO₂ and ethylene production and quality of rocket (*Eruca sativa* Mill.) leaves as affected by leaf age and storage temperature. *Postharvest Biology and Technology* 46: 167-173
- Ku, V.V.V. & Wills, R.B.H. 1999. Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. *Postharvest Biology and Technology* 17: 127-132
- Kukreja, S., Nandwal, A.S., Kumar, N., Sharma, S.K., Unvi, V., Sharma, P.K. 2005. Plant water status, H₂O₂ scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. *Biologia Plantarum* 49: 305-308
- Kunert, K.F. & Ederer, M. 1985. Leaf aging and lipid peroxidation: The role of the antioxidants vitamin C and E. *Physiologia Plantarum* 65: 85-88
- Kunert, K.J. & Foyer, C.H. 1993. Thiol/disulphide exchange in plants. En: De Kok LJ, ed. *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants*. The Hague, The Netherlands: SPB Academia environ Publishing bv, pp. 139-151
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., Schroeder, J.I. 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-

- dependent ABA signaling in Arabidopsis. *European Molecular Biology Organization Journal* 22: 2623–2633
- Lamb, C. & Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275
- Lappartient, A.G. & Touraine, B. 1997. Glutathione-mediated regulation of ATP sulfurylase activity, sulfure uptake, and oxidative stress response in intact Canola roots. *Plant Physiology* 114: 177-183
- Law, M.Y., Charles, S.A., Halliwell, B. 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochemistry Journal* 210: 899-903
- Lea, P.J. & Mifflin, B.J. 2003. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 555-564
- Leclercq, J., Adams-Phillips, L.C., Zegzouti, H., Jones, B., Latché, A., Giovannoni, J.J., Pech, J-C., Bouzayen, M. 2002. *LeCTR1*, a tomato *CTR1*-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in Arabidopsis and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiology* 130: 1132–1142
- Lee, S.K. & Kader, A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* 20: 207-220
- Leferink, N.G.H., van den Berg, W.A.M., Berkel, W.J.H. 2008. L-Galactono-γ-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 275: 713–726
- Lester, E.G., Makus, D.J., Hodges, D.M. 2010. Relationship between fresh-packaged spinach leaves exposed to continuous light or dark and bioactive contents: effects of cultivar, leaf size, and storage duration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2980–2987
- Li, J.M. & Jin, H. 2007. Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends Plant Science* 12: 37–41
- Li, Y., Zhou, Y., Wang, Z., Sun, X., Tang, K. 2010. Engineering tocopherol biosynthetic pathway in Arabidopsis leaves and its effect on antioxidant metabolism. *Plant Science* 178: 312-320
- Lim, P.O., Kim, H.J., Nam, H.G. 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58: 115–136
- Linster, C.L. & Van Schaftingen, E. 2007. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 274: 1–22
- Liso, R., Innocenti, A.M., Bitonti, M.B., Arrigoni, O. 1988. Ascorbic acid-induced progression of quiescent center cells from G1 to S phase. *New Phytologist* 110: 469-471
- Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W., Zhang, S. 2007. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal* 51: 941–954
- Loewus, F.A., Jang, R., Seegmiller, C.G. 1956. The conversion of C14-labeled sugars to L-ascorbic acid in ripening strawberries. *Journal of Biological Chemistry* 222: 649-664
- Loewus, F.A. 1963. Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry* 2: 109-128.
- Loewus, F.A. 1999. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry* 52: 193-210

- Lomaniec, E., Aharon, Z., Aharoni, N., Lers, A. 2003. Effect of ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropene on parsley leaf senescence and ethylene biosynthesis. *Postharvest Biology and Technology* 30: 67-74
- López-Ayerra, B., Murcia, M.A., García-Carmona, F. 1998. Lipid peroxidation and chlorophyll levels in spinach during refrigerated storage and after industrial processing. *Food Chemistry* 61 113-118
- Lorence, A., Chevone, B.I., Mendes, P., Nessler, C.L. 2004. *myo*-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* 134: 1200–1205
- Lucier, G., Allshouse, J., Lin, B-H. 2004. Factors affecting spinach consumption in the United States. Electronic outlook report from the economic research service. Economic Research Service. United States Department of Agriculture. Página visitada en abril de 2010. Disponible on-line: <http://www.ers.usda.gov/publications/VGS/jan04/vgs30001/>
- Lund, S.T., Stall, R.E., Klee, H.J. 1998. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *The Plant Cell* 10: 371-382
- Mach, J.M. & Greenberg, J.T. 2004. Free radicals and oxidative stress. En: *Plant cell death processes*. Ed. Nooden L.D., Elsevier Academic Press, San Diego, pp 203-213
- Maeda, H. & DellaPena, D. 2007. Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 260–265
- Marrs, K. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 127–158
- Martínez, D. & Guamet, J.J. 2004. Distortion of the SPAD 502 chlorophyll meter readings by changes in irradiance and leaf water status. *Agronomie* 24: 41–46
- Masia, A. 1998. Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with especial reference to ethylene. *Physiologia Plantarum* 104: 668-672
- Mathooko, F. 1996. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology* 7: 1-26
- Matsuo, T., Yoneda, T., Ito, S. 1984. A significant error of the thiobarbituric acid assay on lipid peroxidation in senescent leaves. *Agricultural and Biological Chemistry* 48: 1631-1633
- Mattoo, A.K., Baker, J.E., Moline, H.E. 1986. Induction by copper ions of ethylene production in *Spirodela oligorrhiza*: Evidence for a pathway independent of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Journal of Plant Physiology* 123: 193-202
- Mattoo, A.K. & White, W.B. 1991. Regulation of ethylene biosynthesis. In: A.K. Mattoo and J.C. Suttle (Editors), *The plant hormone ethylene*. CRC Press, Boca Raton, Fla., pp. 21-42.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8271–8276
- Maydup, M.L., Antonietta, M., Guamet J.J., Graciano C., López, J.R., Tambussi, E.A. 2010. The contribution of ear photosynthesis to grain filling in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* 119: 48-58

- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Philosoph-Hadas, S. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 43: 1813-1819
- Meister, A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry* 269: 9397-9400
- Melhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G., Foyer, C.H. 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 378: 203-206
- Mendoza-Cozátl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, Andrea, Moreno-Sánchez, R. 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews* 29: 653-671
- Meyer, R.C. Jr., Goldsbrough, P.B., Woodson, W.R. 1991. An ethylene-responsive flower senescence-related gene from carnation encodes a protein homologous to glutathione s-transferases. *Plant Molecular Biology* 17: 277-281
- Miao, Y., Lv, D., Wang, P., Wang X-C., Chen, J., Miao, C., Song, C-P. 2006. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell* 18: 2749-2766
- Millar A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H. 2003. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology* 133: 443-447
- Miller, N.J. & Rice-Evans, C.A. 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry* 60: 331-337
- Mishina, T.E., Lamb, C., Zeier, J. 2007. Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 30: 39-52
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410
- Miyake, C. & Asada, K. 1992. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoregeneration of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiology* 33: 541-553
- Moldau, H., Bichele, I., Hüve K. 1998. Dark-induced ascorbate deficiency in leaf cell walls increases plasmalemma injury under ozone. *Planta* 207: 60-66
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Reviews in Plant Biology* 58: 459-481
- Monshausen, G.B. & Gilroy, S. 2009. Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends in Cell Biology* 19: 228-235
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., Klessig, D.F. 2010. NO synthesis and signaling in plants-where do we stand? *Physiologia Plantarum* 138: 372-383
- Mouillon, J.M., Aubert, S., Bourguignon, J., Gout, E., Douce, R., Rébeillé, F. 1999. Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *The Plant Journal* 20: 197-205

- Mueller, M.J. & Berger, S. 2009. Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry* 70: 1511–1521
- Müller, K. & Borsch, T. 2005. Phylogenetics of amarabthaceae based on *matK/trnK* sequence data-evidence from parsimony, likelihood, and bayesian analyses. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 92: 66-102
- Mullins, E.D., McCollum, T.G., McDonald, R.E. 2000. Consequences on ethylene metabolism of inactivating the ethylene receptor sites in diseased non-climacteric fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19: 155–164
- Munné-Bosch, S. & Alegre, L. 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 31–57
- Munné-Bosch, S. 2005. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 162: 743-748
- Murcia, M.A., Jiménez, A.M., Martínez-Tomé, M. 2009. Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage. *Food Research International* 42: 1046-1052
- Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S., Soave, C. 2004. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *The Plant Journal* 38: 940–953
- Murray, M.B., Cape, J.N., Fowler, D. 1989. Quantification of frost damage in plant tissues by rates of electrolyte leakage. *New Phytologist* 113: 307-311
- Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E.A., Mackerness, S., Buchanan- Wollaston, V. 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 54: 2285–2292
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129: 185–195
- Nishikawa, F., Kato, M., Hyodo, H., Ikoma Y., Sugiura, M., Yano, M. 2005. Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets. *Journal of Experimental Botany* 56: 65–72
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K. 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonolactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *Journal of Biological Chemistry* 269: 13685–13688
- Niyogi, K.K. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 455-460
- Noctor, G., & Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249–279
- Noctor, G., Arisi A-C. M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, C.H. 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49: 623-647
- Noctor, G., De Paepe, R., Foyer, C.H. 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 12: 125–134

- Noodén, L.D., Guamet J.J., John, I. 1997. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* 101: 746–753
- Novabpour, S., Morris, K., Rebecca, A., Harrison, E., A-H-Mackerness, S., Buchanan-Wollaston, V. 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 54: 2285-2292
- Ōba, K., Fukui, M., Imai, Y., Iriyama, S., Nogami, K. 1994. L-galactono- 1,4-lactone dehydrogenase: partial characterization, induction of activity and role in the synthesis of ascorbic acid in wounded white potato tuber tissue. *Plant Cell Physiology* 35: 473-478
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O., Bowles, D.J. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917
- Oliveira do Nascimento, J.R., Kojima, H.B., Passanezi Araújo Gómez, M.L., Akira Oshiro, R., Lajolo Franco, M. 2005. L-Ascorbate biosynthesis in strawberries: L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. *Postharvest Biology and Technology* 38: 34–42
- Olsson, M. E., Ekvall, J., Gustavsson, K-E., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., Svensson, U., Åkesson, B., Nyman, M.G.L. 2004. Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria × ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2490–2498
- Pandrangi, S. & LaBorde, L.F. 2004. Retention of folate, carotenoids, and other quality characteristics in commercially packaged fresh spinach. *Journal of Food Science* 69: 702C-707C
- Pardha, S. P., Alia, S. A., Prasad, K. V. S. K. 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 209: 1-5
- Pastori, G.M., Kiddle, G., Antoniow, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P.J., Noctor, G., Foyer, C.H. 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell* 15: 939–951
- Patil, B. S., Pike, L.M., Hamilton, B.K. 1995. Changes in quercetin concentration in onion (*Allium cepa* L.) owing to location, growth stage and soil type. *New Phytologist* 130: 349–355
- Paull, R.E. 1999. Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. *Postharvest Biology and Technology* 15: 263-277
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniow, J., Alvarez, M.E., Foyer, C.H. 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 1291–1303
- Perez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M., Cejudo, F.J. 2006. Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *The Plant Cell* 18: 2356–2368
- Peterson, C.A., Errell, J.A., Erdman J.W.Jr. 1992. Bone composition and histology of young growing rats fed diets of varied calcium bioavailability: spinach, nonfat dried milk, or calcium carbonate added to casein. *Journal of Nutrition* 122: 137-144
- Philosoph-Hadas, S., Pesis, E., Meir, S., Reuveni, A. & Aharoni, N. 1989. Ethylene-enhanced senescence of leafy vegetables and fresh herbs. *Acta Horticulturae* 1: 37-45

- Philosoph-Hadas, S., Meir, S., Aharoni, N. 1991. Effects of wounding on ethylene synthesis and senescence of detached spinach leaves. *Physiologia Plantarum* 83: 241-246
- Pickett, C. B. & Lu, A. Y. H. 1989. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annual Reviews in Biochemistry* 58: 743-764
- Pineau, B., Layoune, O., Danon, A., De Paepe, R. 2008. L-Galactono-1,4-lactone Dehydrogenase Is Required for the Accumulation of Plant Respiratory Complex I. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 32500–32505
- Porfirova, S., Bergmüller, E., Tropf, S., Lemke, R., Dörmann, P. 2002. Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 99: 12495–12500
- Proietti, S., Moscatello, S., Leccese, A., Colla, G., Battistelli, A. 2004. The effect of growing spinach (*Spinacia oleracea* L.) at two light intensities on the amounts of oxalate, ascorbate and nitrate in their leaves. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 606–609
- Puntarulo, S., Sanchez, R.A., Boveris, A. 1988. Hydrogen Peroxide Metabolism in Soybean Embryonic Axes at the Onset of Germination. *Plant Physiology* 86: 626–630
- Queval, G., Thominet, D., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Gakière, B., Noctor, G. 2009. H₂O₂-activated up-regulation of glutathione in arabidopsis involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Molecular Plant* 2: 344–356
- Rahman, I., Kode, A., Biswas, S.K. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature protocols* 1: 3159-3165
- RESOLUCION RX 297 83 (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca – Ministerio de Economía. Presidencia de la Nación Argentina).
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C., Siedow, J.N. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiology* 141: 357–366
- Rise, M., Cojocar, M., Gottlieb, H.E., Goldschmidt, E.E. 1989. Accumulation of α-tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation. *Plant Physiology* 89: 1028-1030
- Roberts, J. C. & Francetic, D.J. 1993. The importance of sample preparation and storage in glutathione analysis. *Analytical Biochemistry* 211: 183-187
- Rohmer, M. 2003. Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure and Applied Chemistry* 75: 375–387
- Rolny, N., Costa, L., Carrión, C., Guamet, J.J. 2011. Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 1220-1227
- Rupert, B., Cattivelli, L., Pagni, S., Ramina, A. 2002. Ethylene responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *Journal of Experimental Botany* 53:429-437
- Saito, K. 2000. Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 188-195
- Sakai, H., Hua, J., Che, Q.C., Chang, C., Medrano, L.J., Bleecker, A.B., Meyerowitz, E.M. 1998. *ETR2* is

- an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5812-5817
- Salgado, J., Villalán, J., Gómez-Fernández, J. C. 1993a. Magic-angle spinning C-13 NMR spin-lattice relaxation study of the location and the effects of α -tocopherol, ubiquinone-10 and ubiquinol-10 in unsonicated model membranes. *European Biophysics Journal* 22: 151–155
- Salgado, J., Villalán, J., Gómez-Fernández, J. C. 1993b. α -Tocopherol interacts with natural-micelle forming single-chain phospholipids stabilizing the bilayer phase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 306: 368–376
- Salisbury, F.B. & Ross, C.W. 1992a. *Plant Physiology*. Fourth Edition. Wadsworth Publishing, California, USA. pp. 385-386
- Salisbury, F.B. & Ross, C.W. 1992b. *Plant Physiology*. Fourth Edition. Wadsworth Publishing, California, USA. pp. 281-284
- Sanchez-Fernández, R., Fricker, M., Corben, L.B., White, N.S., Sheard, N., Leaver, C.J., Van Montagu, M., Inzé, D., May, M.J. 1997. Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 2745–2750
- Schippers, J.H.M., Jing, H.C., Hille, J., Dijkwel, P.P. 2007. Developmental and hormonal control of leaf senescence, in: Gan S. (Ed.), *Senescence Processes in Plants, Annual Plant Reviews*, vol. 26, Blackwell Publishing Ltd. pp. 145–170.
- Schöner, S. & Krause, G.H. 1990. Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta* 180: 383-389
- Scott, J.W., Bizzarro, F.T., Parrish, D.R., Saucy, G. 1976. Syntheses of (2R,4-5,8-R)- α -tocopherol and (2R,3-E,7-E)- α -tocotrienol. *Helvetica Chimica Acta* 59:290–306
- Shao, H.B., Liang, Z.S., Shao, M.A., Sun, Q. 2005. Dynamic changes of antioxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. *Biointerfaces* 42: 187–195
- Shao, H.B. Chu, L.Y. Wu G., Zhang, J-H., Lu, Z-H., Yu, Y-C. 2007. Changes of some antioxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. *Biointerfaces* 54: 143–149
- Sharma, Y.K & Davis, K. 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 480-488
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305-1319
- Shintani, D. & DellaPenna, D. 1998. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* 282: 2098–2100
- Siendones, E., González-Reyes, J.A., Santos-Ocaña, C., Navas, P., Córdoba, F. 1999. Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiology* 120: 907–912

- Simontacchi, M. & Puntarulo, S. 1994. Effect of ageing on oxygen radical generation by soybean seeds. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 102B: 295-302
- Sisler, E.C., Goren, R., Huberman, M. 1985. Effect of 2,5-norbornadiene on abscission and ethylene production in citrus leaf explants. *Physiologia Plantarum* 63: 114-120
- Sisler, E.C. & S.M. Blankenship. 1993. Diazocyclopentadiene, a light sensitive reagent for the ethylene receptor. *Plant Growth Regulation* 12: 125-132
- Sisler, E.C. & Blankenship, S.M. 1996. Method of counteracting an ethylene response in plants, U.S. Patent Number 5,518,988
- Sisler, E.C. & Serek, M. 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiologia Plantarum* 100: 577-582
- Sisler, E.C., Serek, M., Dupille, E., Goren, R. 1999. Inhibitions of ethylene responses by 1-methylcyclopropene and 3-methylcyclopropene. *Plant Growth Regulation* 27: 105-111
- Sisler, E.C. & Serek, M. 2003. Compounds interacting with the ethylene receptor in plants. *Plant Biology* 5: 473-80
- Smillie, R.M., Hetherington S.E., Nott, R., Chaplin, G.R., Wade, N.L. 1987. Applications of chlorophyll fluorescence to the postharvest physiology and storage of mango and banana fruit and the chilling tolerance of mango cultivars. *Asian Food Journal* 3: 55-59
- Smirnoff, N. & Pallanca, J.E. 1996. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 24: 472-478
- Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 229-235
- Smirnoff, N. & Wheeler, G.L. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35: 291-314
- Smirnoff, N. 2001. L-Ascorbic acid biosynthesis. *Vitamins & Hormones* 61: 241-266
- Smirnoff, N., Conklin, P.L., Loewus, F.A. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 437-467
- Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S., Goldsbrough, P.B. 2003. *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *The Plant Journal* 36: 433-44
- Soll, J. & Schultz, G. 1979. Comparison of geranylgeranyl and phytyl substituted methylquinolsin the tocopherol synthesis of spinach chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 91: 715-720
- Soll, J., Schultz, G., Joyard, J., Douce, R., Block, M.A. 1985. Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach-chloroplasts. *Architectural Biochemistry and Biophysics* 238: 290-299
- Spychalla, J. & Desborough, S. 1990. Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiology* 94: 1214-1218

- Stepanova, A.N. & Ecker, J.R. 2000. Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 353–360
- Stephensen, C.B., Franchi, L.M., Hernandez, H., Campos, M., Gilman, R.H., Alvarez, J.O. 1998. Adverse effects of high-dose vitamin A supplements in children hospitalized with pneumonia. *Pediatrics* 101: 1-8
- Sure, B. 1924. Dietary requirements for reproduction. II. The existence of a specific vitamin for reproduction. *Journal of Biological Chemistry* 58: 693–709
- Svent-Györgi, A.V. 1927. The chemistry of the Adrenal Cortex. *Nature* 129: 782-783
- Svent-Györgi, A. 1928. Observations on the function of the peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. Description of a new carbohydrate derivative. *Biochemistry Journal* 22: 1387-1409
- Svent-Györgi, A. 1931. On the function of hexuronic acid in the respiration of the cabbage leaf. *Journal of Biological Chemistry* 90: 385
- Svent-Györgi, A., 1933. Identification of vitamin C. *Nature* 131: 225-226
- Tabata, K., Ōba, K., Suzuki, K., Esaka, M. 2001. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *The Plant Journal* 27: 139-148
- Tabata K, Takaoka T, Esaka M. 2002. Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry* 61: 631–635
- Tambussi, E., Bartoli, C.G., Guamet, J.J., Beltrano, J., Araus, J.L. 2000. Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiologia Plantarum* 108: 398-404
- Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54: 733-749
- Tang, G., Qin, j., Dolnikowski, G.G., Russell, R.M., Grusak, M.A. 2005. Spinach or carrots can supply significant amounts of vitamin A as assessed by feeding with intrinsically deuterated vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition* 82: 821-828
- Taylor, N.L., Tan, Y.F., Jacoby, R.P., Millar, A.H. 2009. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *Journal of Proteomics* 72: 367–378
- Templar, J., Kon, S.P., Milligan, T.P., Newman, D.J., Raftery, M.J. 1999. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrology Dialysis Transplantation* 14: 946-951
- Theologis, A., 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70: 181-184
- Thompson, J.E. 1988. The molecular basis for membrane deterioration during senescence. En: Noodén, L.D., Leopold, A.C. (Editores). *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press pp. 51-83.
- Thompson, J.E., Froese, C.D., Madey, E., Smith, M.D., Hong, Y.W. 1998. Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research* 37: 119–141

- Tietze, F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissue. *Analitical Biochemistry* 27: 502-522
- Timmerman, K. P. 1989. Molecular characterization of corn glutathione S-transferase isozymes involved in herbicide detoxication. *Physiologia Plantarum* 77: 465-471
- Tomaszewski, Z., Kuklin, A.I., Sams, C.E., Conger, B.V. 1994. Influence of low temperature preincubation on somatic embryogenesis and ethylene emanation from orchards grass leaves. *Plant Growth Regulation* 14: 229-234
- Toledo, M.E.A., Ueda, Y., Imahori, Y., Ayaki, M. 2003. L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biology and Technology* 28: 47-57
- Torres, M.A. & Dangl, J.L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 397-403
- Trippi V. & Thimann K.V., 1983. The exudation of solutes during senescence of oat leaves. *Physiologia Plantarum* 58: 21-28
- Trümper, S., Follmann, I., Häberlein, I. 1994. A novel dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts homologous to plant trypsin inhibitor. *Federation of the European Biochemical Societies Letters* 352: 159-162
- United States Department of Agriculture. 1946. United States standards for grades of spinach leaves (fresh). Agricultural Marketing Service. Fruit and Vegetable Division. Fresh Products Branch.
- Valentin, H.E., Lincoln, K., Moshiri, F., Jensen, P.K., Qi, Q., Venkatesh, T.V., Karunanandaa, B., Baszis, S.R., Norris, S.R., Savidge, B., Gruys, K.J., Last, R.L. 2006. The *Arabidopsis* vitamin E pathway gene *vte5-1* mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell* 18: 212-224
- Valpuesta, V. & Botella, M.A. 2004. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science* 9: 573-577
- Vanacker, H., Sandalio, L., Jimenez, A., Palma, J.M., Corpas, F.J., Meseguer, V., Gomez, M., Sevilla, F., Leterrier, M., Foyer, C.H., del Rio, L.A. 2006. Roles for redox regulation in leaf senescence of pea plants grown on different sources of nitrogen nutrition. *Journal of Experimental Botany* 57: 1735-1745
- Veljovic-Jovanovic, S.D., Pignocchi, C., Noctor, G., Foyer, C.H. 2001. Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intercellular redistribution of antioxidant system. *Plant Physiology* 127: 426-435.
- Vinson, J.A., Su, X., Zubik, L., Bose, P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5315-5321
- Vinson, J.A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L. 1998. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3630-3634
- von Caemmerer, S. & Quick, W.P. 2000. Rubisco: Physiology *in vivo*. En: *Photosynthesis and metabolism*. Leegood, R.C., Sharkey, T.D., von Caemmerer, S. (Eds), 85-113

- Wang, C.Y. 1993. Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. *Horticultural Review* 15: 63-95
- Wang, K.L.C., Li, H., Ecker, J.R. 2002. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell* S131–S151, Supplement 2002, www.plantcell.org © 2002 American Society of Plant Biologists
- Wang, Y., Chang, C-F., Chou, J., Chen H-L., Deng, X., Harvey Brandon, K., Cadet, J.L., Bickford, P.C. 2005. Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage. *Experimental Neurology* 193: 75– 84
- Watada, A. E., Kim, S. D., Kim, K.S., Harris, T.C. 1987. Quality of green beans, bell peppers and spinach stored in polyethylene bags. *Journal of Food Science* 52: 1637–1641
- Watkins, C.B. 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances* 24: 389–409
- Wheeler, G.L., Jones, M.A., Smirnoff, N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365–369
- Whitaker, J.R. 1990. New and future uses of enzymes in food processing. *Food Biotechnology* 4: 669-697
- Whitlow, T.H., Bassuk, N.L., Ranney, T.G., Reichert, D.L. 1992. An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues. *Plant Physiology* 98: 198-205
- Wiegand, R. L., Shah, D. M., Mozer, T. J., Harding, E. I., Diaz-Collier, J., Sauders, C., Jaworski, E. G. & Tiemeier, D. C. 1986. Messenger RNA encoding a glutathione-S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment. *Plant Molecular Biology* 7: 235-243
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *European Molecular Biology Organization Journal* 16: 4806–4816
- Wills, H., R.B.H., Ku, V.V.V., Warton, M.A. 2002. Use of 1-methylcyclopropene to extend the postharvest life of lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 1253-1255
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., Joyce, D. 1998. *Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals*. CAB International: Wallingford Oxon, U.K.
- Wolf, G. 2005. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *Journal of Nutrition* 135: 363–366
- Yamauchi, N. & Watada, A.E. 1991. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 116: 58-62
- Yamauchi, R. & Matsushita, S. 1979. Light-induced lipid peroxidation in isolated chloroplasts and the role of α-tocopherol. *Agricultural and Biological Chemistry* 43: 2157–62
- Yanagisawa, S., Yoo, S.D., Sheen, J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* 425: 521–525
- Yang, S.F. & Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 155-189
- Ye, W. & Dilley, D.R. 1992. Development of ACC oxidase activity during maturation and ripening of ‘Paulared’, ‘Empire’ and ‘Law Rome’ apples. *Postharvest Biology and Technology* 1: 195-202

- Yu, Y.B., Adams, D.O., Yang, S.F. 1979. 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 198: 280-286
- Zelitch, I. 1972. Comparison of the effectiveness of glycolic acid and glycine as substrates for photorespiration. *Plant Physiology* 50: 109-113
- Zhang, D., Hendricks, D.G., Mahoney, A.W. 1989. Bioavailability of total iron from meat, spinach (*Spinacea oleracea* L.) and meat-spinach mixtures by anaemic and non-anaemic rats. *British Journal of Nutrition* 61: 331-343
- Zhou, J. & Goldsbrough, P. B. 1993. An Arabidopsis gene with homology to glutathione S-transferases is regulated by ethylene. *Plant Molecular Biology* 22: 517-523.
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P. 1997. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry* 253: 162-168
- Zimmermann, P., Heinlein, C., Orendi, G., Zentgraf, U. 2006. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant, Cell and Environment* 29: 1049–1060

7. Resumen

7. Resumen

Los antioxidantes constituyen una parte importante de la dieta de los humanos. Entre ellos se pueden mencionar las vitaminas, las cuales no se pueden sintetizar y deben ser adquiridas por medio del consumo de vegetales. Dentro de las vitaminas, se estudió el ácido ascórbico (AA) (Vitamina C) y los tocoferoles (vitamina E). Sin embargo, hasta la fecha, no se han dilucidado todos los factores hormonales y físicos que estimulan su síntesis o que determinan su deterioro. Esto a su vez se encuentra fuertemente relacionado con dos factores importantes: por un lado, el valor nutricional y, por otro, la vida postcosecha de los productos. En la presente tesis se ha demostrado que aplicaciones de etileno disminuyen fuertemente el contenido de AA en etapas muy tempranas de la senescencia, antes que otros indicadores de la senescencia, como es el contenido de clorofila o el rendimiento cuántico potencial del fotosistema II. Este efecto se ve fuertemente marcado en hojas maduras de espinaca (*Spinacia oleracea* L.), mientras que esos efectos no son tan notorios en hojas jóvenes.

Por otro lado, al estudiar la vía de señalización del etileno, se vio que el mutante de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de respuesta constitutiva al etileno (*ctr1-1*), presenta una senescencia acelerada y el contenido de AA disminuye muy fuertemente cuando sus hojas son almacenadas en oscuridad. También se estudiaron los mutantes insensibles a la acción del etileno (*ein2-1*, *ein3-1* y *ein4*), los cuales vieron retardada su senescencia y los contenidos de AA fueron mayores respecto del control silvestre. Esto estaría indicando un efecto marcado del etileno endógeno sobre el contenido de antioxidantes

Respecto de los tocoferoles, se ha encontrado una modificación en el patrón de síntesis en los mutantes insensibles al etileno, mientras que el mutante de respuesta constitutiva presenta un patrón similar al control. Por lo tanto, se propone que podría haber una relación entre antioxidantes hidrosolubles y liposolubles mediada por etileno.

A partir de estos resultados, se optó por utilizar inhibidores de la acción del etileno, como es el 1-metilciclopropeno (1-MCP), para estudiar el efecto endógeno del etileno sobre hojas de espinaca. Este producto gaseoso tiene una acción selectiva y se une irreversiblemente a los receptores de etileno, lo que evita la cadena de respuesta ante la presencia de esta hormona. Se encontró que aplicaciones exógenas de 1-MCP

aminoraron la aparición de los síntomas clásicos de senescencia y aminoraron la pérdida de AA cuando las hojas fueron llevadas a la oscuridad. También se probaron combinaciones de 1-MCP y almacenamiento en oscuridad a 4 °C, y se encontraron efectos positivos que se prolongaron por el término de un mes desde el momento en que las hojas recibieron al inhibidor del etileno.

Dentro de los tratamientos físicos se evaluaron aplicaciones de pulsos de luz de baja intensidad y por períodos cortos de tiempo a hojas maduras de espinaca. Se hicieron diferentes combinaciones de tiempos y frecuencias de exposición a hojas maduras de espinaca que fueron de 15 min con frecuencias de pulsos cada 2 y 6 h y de 7 min cada 2 h. Se ha determinado que la duración de los pulsos no es tan determinante como su frecuencia; por lo que pulsos cortos pero frecuentes mejoran la calidad postcosecha de hojas maduras de espinaca. Se ha visto un mantenimiento del contenido de AA y un aumento en la actividad de las enzimas de síntesis, que recuperan las formas oxidadas de AA con aplicación de pulsos de luz. También se han visto aumentos significativos en el contenido de glutatión reducido. Las diferencias halladas en estos tratamientos no se vieron diluídas al almacenar las hojas en oscuridad a 4 °C por una semana más.

Viendo los efectos benéficos en la postcosecha de espinaca del 1-MCP, los pulsos de luz y la refrigeración, se procedió a hacer ensayos combinando dichos factores. Como es de esperar, los tratamientos que combinaban pulsos de luz y 1-MCP mejoraron la calidad postcosecha de hojas maduras de espinaca y los contenidos de AA se mantuvieron en valores similares a los hallados en hojas recién cortadas. Sin embargo, pasada una semana de almacenamiento en frío y oscuridad, los efectos de los tratamientos combinados no presentaron diferencias respecto de los otros tomados individualmente, lo que estaría indicando que los efectos sinérgicos encontrados en un principio no son duraderos y tienden a tener valores similares hacia el final de los ensayos.

Abstract

Antioxidants are an important part of the human diet. These may include vitamins, which can not be synthesized and must be acquired through consumption of vegetables. Among the vitamins, ascorbic acid (AA) (vitamin C) and tocopherols (vitamin E) were studied. However, until recently there have not been elucidated all hormonal and physical factors that stimulate synthesis or their impairment. This is strongly related to two main factors: on the first hand, the nutritional value and, second, in the post-harvest life of products. The present thesis has shown that application of ethylene strongly reduced AA content in very early stages of senescence, before other synthoms of senescence such as chlorophyll content or the potential quantum yield of photosystem II. This effect is strongly marked in mature leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.), while these effects are not notorious in young leaves.

On the other hand, the constitutive ethylene response mutant (*ctr1-1*) of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, presents an accelerated senescence and AA content decreases very strongly when its leaves are stored in the dark. Insensitive mutants (*ein2-1*, *ein3-1* and *ein4*), showed delayed senescence and AA contents were higher than the wild type. This indicates a marked effect of endogenous ethylene on antioxidant content.

Within the tocopherols, it has been found a change in the pattern of synthesis in the ethylene insensitive mutants, while the constitutive response mutant shows a similar pattern to the wild type. Therefore, this suggests that there might be a relationship between lipid-soluble and water-soluble antioxidants mediated by ethylene.

From these results, we used an ethylene inhibitor, such as 1-methylcyclopropene (1-MCP), to study the endogenous effect of ethylene on spinach leaves. This product is a selective gas that binds irreversibly to ethylene receptors, preventing the chain reaction response in the presence of this hormone. Application of 1-MCP slowed the onset of senescence and slowed the loss of AA when the leaves were stored in the darkness. It has been also tested the combinations of 1-MCP and storage in the dark at 4 ° C. It was found positive effects up to one month when the leaves were treated with the inhibitor of ethylene.

Within the physical treatments, we evaluated the use of low intensity light pulses for short periods of time to mature spinach leaves. We used different combinations of time and frequency of exposure to mature spinach. Leaves were treated with 15 min pulse every 2 or 6 h for 3 d and with pulses of 7 min every 2 h for 3 d. The duration of the pulses is not as crucial as the frequency of the pulses; so short but frequent pulses improved postharvest quality of mature leaves of spinach. The content of AA was kept at higher levels and there was an increase in the activity of synthetic enzymes, which retrieves the oxidized forms of AA with application of light pulses. We also observed significant increases in the content of reduced glutathione. The differences found in these treatments were also observed when leaves were placed in the dark at 4 ° C for another week.

Taken together these results on spinach post-harvest with of 1-MCP, light pulses and cooling, it has been tested the combination of these beneficial factor together. As expected, treatments combining light pulses and 1-MCP improved post-harvest quality of mature leaves of spinach and AA contents were maintained at levels similar to those found in freshly cut leaves. However, after a week of cold and dark storage, the effects of combined treatments did not differ with respect to the others taken individually, which would indicate that the synergistic effects found in the beginning do not last and tend to have similar values towards the end of the experiments.

Ing. Agr. Ing. Ftal. Gustavo Esteban Gergoff Grozeff
Tesisista

Dr. Carlos Guillermo Bartoli
Director

Dra. Alicia Raquel Chaves
Codirectora